

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIA CELESTINA BONZANINI GRAZZIOTIN

**EFEITO DOS DIFERENTES MODOS E TEMPOS DE ESTOCAGEM SOBRE A
ACIDEZ E O VALOR CALÓRICO DO LEITE HUMANO ORDENHADO CRU DE
MÃES COM RECÉM-NASCIDOS INTERNADOS NUMA UNIDADE DE
NEONATOLOGIA**

CURITIBA

2014

MARIA CELESTINA BONZANINI GRAZZIOTIN

**EFEITO DOS DIFERENTES MODOS E TEMPOS DE ESTOCAGEM SOBRE A
ACIDEZ E O VALOR CALÓRICO DO LEITE HUMANO ORDENHADO CRU DE
MÃES COM RECÉM-NASCIDOS INTERNADOS NUMA UNIDADE DE
NEONATOLOGIA**

**Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do grau de Mestre em
Saúde da Criança e do Adolescente, com
área de concentração em Neonatologia, do
Setor de Ciências da Saúde da Universidade
Federal do Paraná.**

**Orientadora: Prof.^a Dr.^a Regina Paula
Guimarães Vieira Cavalcanti da Silva
Coorientadora: Dr.^a Marcia Helena de
Souza Freire**

CURITIBA

2014

G785 Grazziotin, Maria Celestina Bonzanini.
Efeito dos diferentes modos e tempos de estocagem sobre a acidez e o valor calórico do leite humano ordenhado cru de mães com recém-nascidos internados numa unidade de neonatologia / Maria Celestina Bonzanini Grazziotin. – Curitiba, 2014.
219 f.: il.; color.; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Paula Guimarães Vieira Cavalcanti da Silva.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente do Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

1. Aleitamento materno. 2. Prematuro. 3. Bancos de leite – provisão & distribuição. I. Título. II. Silva, Regina Paula Guimarães Vieira Cavalcanti da.

NLM: WS 125



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

*Programa de Pós-Graduação Mestrado e Doutorado
em Saúde da Criança e do Adolescente*



Parecer

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO - MESTRADO E DOUTORADO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE**, do Setor de Ciências Saúde, da Universidade Federal do Paraná, após arguir a Mestranda

Maria Celestina Bonzanini Graziotin

em relação ao seu trabalho de Dissertação de Mestrado intitulado:

"EFEITO DOS DIFERENTES MODOS E TEMPOS DE ESTOCAGEM SOBRE A ACIDEZ E VALOR CALÓRICO DO LEITE HUMANO ORDENHADO DE MÃE COM RECÉM-NASCIDOS INTERNADOS NUMA UNIDADE DE NEONATOLOGIA"

é de parecer favorável à *Aprovação* da acadêmica, habilitando-a ao título de *Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente*, Área de concentração em *Neonatologia e Terapia Intensiva Neonatal - Enfermagem*.

Curitiba, 18 de dezembro de 2014.

Regina P. G. Vieira Cavalcante Silva
Professora Regina Paula Guimarães Vieira Cavalcante da Silva
UFPR, Orientadora e Presidente da Banca Examinadora.

maria beatriz do nascimento
Professora Maria Beatriz Reinert do Nascimento
UNIVILLE-SC, Primeira Examinadora.

Claudia Choma Bettge Almeida
Professora Cláudia Choma Bettge Almeida
UFPR, Segunda Examinadora.

Monica Nunes Lima Cat
Professora Mônica Nunes Lima Cat
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação - Mestrado e Doutorado em Saúde da Criança e do Adolescente

Rua: General Carneiro, 181 - 14º andar - Alto da Glória - Curitiba - PR - CEP 80060-900
Coordenação: (041) 3360-1863 - e-mail: monica.lima.ufpr@gmail.com - Secretária: (041) 3360-7990 - e-mail: pgadped@hc.ufpr.br - clara.lara@ufpr.br

Homenageio a todas as mães prematuras,
Não somente em gestação e amamentação,
Prematuras na emoção mas com fé sem medida,
Persistiram no caminho da luta pela vida.

Porque se tornar mãe prematura,
É ver-se de repente perdida e insegura,
Mesmo sem perder a paciência e a ternura,
Mesmo sendo adolescente ou mulher madura.

Às mães prematuras que tentaram e perderam a esperança,
Até as que nem experimentaram, tamanha a sua dor,
Às que buscaram por auxílio e aprenderam a ter confiança,
E apesar do empecilho, encontraram força na fonte do amor.

Às que amamentaram sabendo desta vivência a dois,
Às que se emocionaram, apesar da dor, mantiveram a doçura,
Às que persistiram e se doaram pensando num depois
E doaram seu leite nutrindo o filho de outra mãe prematura.

Às mães que desta pesquisa participaram
Sem elas, meu sonho não seria hoje realidade
Mesmo sabendo do anonimato, me apoiaram,
A estas mães prematuras agradeço com humildade.

Dedico....

Às crianças de qualquer nação
Às crianças de qualquer cor,
Às que nasceram desejadas,
Às que nasceram de repente
Às que nasceram amparadas,
Às que nasceram diferente.

O leite materno é o melhor alimento,
Próprio da espécie, o mais natural,
Ao crescimento e desenvolvimento,
A força de proteção sem igual
Mas é o ato da mãe levar ao peito
Próximo à fonte, para sua criança
É aconchego, seu ninho, seu leite
É um ato de paciência e doação,
De uma força que brota do amor.
Que exercita o físico e a mente,
Numa troca infinita de afeto e calor
Que semeia energia e esperança
Que enche a mãe de fé e Paz,
A criança aprende a ter confiança.

E a criança ao ser levada ao seio,
Em seu movimento de procura,
Pede pelo leite pra saciar a sua fome,
Pede pelo colo pra saciar-se no ninho,
E procura pelo contato, pelo olhar,
E pede por aconchego, por carinho.
Se a mãe lhe der tudo isto e mais o leite
A criança cresce de corpo e mente
Num exercício de mútuo benefício.
Gerado da mesma fonte em que nasceu.

AGRADECIMENTOS

À vida por esta oportunidade de estar "aqui"; às pessoas que caminharam comigo neste tempo e conseguiram compreender meu jeito de ser; às que acreditaram em mim mais do que eu mesma; e às pessoas que, de alguma forma, me provocaram desafios;

Às "mães prematuras", nutrizes e às doadoras das amostras, que tornaram possível realizar esta meta especial para minha história de vida;

À Dr.^a Márcia Helena de Souza Freire pelo seu tempo dedicado, aconselhamento e amizade, e sem a qual minhas dificuldades teriam sido muito maiores;

À Dr.^a Regina Paula Vieira Cavalcanti da Silva por ter acreditado na importância desta pesquisa e apoio na realização desta meta;

À doutoranda Ana Laura Grazziotin pelo incentivo para que eu concretizasse esta meta, pela ajuda persistente e por semear em mim a fé da conquista que eu mesma coloquei em dúvidas muitas vezes.

À Dra Marizilda Martins pelas sugestões e análise crítica que me despertaram para a melhoria da construção desta pesquisa.

À Dr.^a Mônica Nunes Lima, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente pela confiança em mim depositada e à Clara Lara Freitas, secretária, sempre disposta e responsável e pela amizade.

À Supervisora de enfermagem da Unidade da Mulher e do Recém-nascido (UMRN), Mestre Sandra Schefer Cardoso, pela amizade, compreensão, e o incentivo à pesquisa e pela flexibilização dos horários para estudo; à secretária da UMRN, Roberta Renner Cavalheiro pela costumeira disponibilidade;

À equipe de Enfermagem do Banco de leite Humano que vivenciou o dia a dia de meus passos colaborando com o incentivo e orientações às mães doadoras e especialmente as técnicas de Enfermagem Roselene Molletta Julliato, Consuelo Trancoso, Margareth Eunice Santos, Ester Ribeiro Conceição pela busca ativa das nutrizes, à Maria Aparecida da Silva, Viviane Milani e Marilene de Oliveira pela colaboração durante o meu estudo; à Aurélia Baltazar de Souza e Lídia Pereira da Silva pela preocupação com a limpeza e manutenção do material usado para as amostras;

À equipe da Nutrição do Banco de Leite Humano pela amizade, confiança e coleguismo no trabalho e à Nutricionista Dayane Coldibelli pelo apoio nos meus momentos de ansiedade e pelas dicas muito úteis;

Ao Nutricionista Rodrigo Carvalho e à fonoaudióloga Claudia Moreira que estiveram comigo por pouco tempo mas foram as pessoas que me deram o impulso para esta meta em minha vida, e valorizaram meu trabalho como Enfermeira em aleitamento materno.

Às filhas Ana Laura Grazziotin e Ana Line Grazziotin que mudaram a minha forma de viver, de sentir e de ser, num processo contínuo de aprendizagem e amadurecimento. Amor que me fez conhecer a experiência de ser mãe e ter amamentado ainda que não da forma ideal, por desconhecimento na época. E hoje pela amizade, companheirismo e porque me fizeram crer que eu conseguiria.

Ao poder Supremo, às forças do Universo. Para quem crê, sabe que aqui se faz presente.

Observei o leite materno no microscópio. Ele é radiante e brilha, ele vive, enquanto o leite artificial parece preto, está morto... O leite materno tem seu significado único em razão da energia vital que a criança recebe.

(Eva Reich)

Observo uma mãe amamentando e percebo a energia vital e o magnetismo neste ato em que ela aninha o filho ao colo, envolve-o com o calor do seu abraço, embala-o ao som do seu coração, fortalece-o com o olhar, enquanto lhe fornece o alimento que brota de dentro de si.

RESUMO

O leite humano (LH) é naturalmente o alimento inigualável, ideal ao crescimento e ao desenvolvimento de todos os recém-nascidos prematuros e de termo, pela sua composição espécie-específica. Nas situações em que a criança está impossibilitada de sugar, o leite da própria mãe pode ser ofertado exclusivo e cru. **Objetivo:** analisar os efeitos de diferentes modos e tempos de estocagem sobre a acidez (AD) e o valor calórico (VC) do LH ordenhado cru (LHOC) de mães com crianças internadas no Serviço de Neonatologia. **Métodos:** Estudo de coorte, prospectivo, observacional e analítico. Foram analisadas 100 amostras de LH, de 100 mães, coletadas no período da manhã, em ambiente específico em um BLH. Após a coleta de um mínimo de 30 mL, as amostras foram divididas em três porções, em frascos separados. Uma amostra foi analisada imediatamente a fresco, na temperatura ambiente (LHF); outra após refrigeração ($\leq 5^{\circ}\text{C}$) por 12 horas (LHR) e a outra após congelamento (-18 e -26°C) por 15 dias (LHC). O grau de AD foi determinado pela técnica de titulação *Dornic*, e para o VC foi realizada a técnica de crematócrito, ambas técnicas padronizadas pela Rede Brasileira de BLH. **Resultados:** O grupo de doadoras apresentou média de 28 ± 5 (16 a 43) anos e de $35,5 \pm 3,5$ (24 a 41) semanas de idade gestacional (IG). Quarenta e nove doadoras tiveram parto a termo e 51 parto prematuro, e tempo de lactação no momento da coleta com mediana de 4 dias (2 a 17) dias. A análise de AD apresentou médias de $2,8 \pm 0,9^{\circ}\text{D}$ para o LHF e de $3,1 \pm 0,9^{\circ}\text{D}$ para o LHR e LHC. Os menores valores de AD foram de $1,3^{\circ}\text{D}$ no LHF e de $1,6^{\circ}\text{D}$ no LHR e LHC e os valores máximos 4,4; 5,6 e $4,7^{\circ}\text{D}$, respectivamente. Houve diferença estatisticamente significativa na AD do LHF em relação ao LHR e LHC, entretanto o mesmo não ocorreu entre estes dois modos de estocagem. Na análise do crematócrito, o VC médio encontrado em Kcal/100mL foi de $56,5 \pm 15,8$ para LHF, de $55,8 \pm 14,1$ para LHR e de $55,9 \pm 14,2$ para o LHC. Os VC mínimos e máximos encontrados foram de 39 a 124,1 para LHF, de 39 a 116,6 para LHR e de 39,2 a 116,1 para LHC. Quando as amostras foram agrupadas de acordo com idade gestacional da doadora (termo e prematuro), observou-se média mais elevada para AD, e média menor para o VC do grupo prematuro, com significância estatística somente para AD no LHF em relação ao LHR, entre estes dois grupos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre todos grupos para as médias de VC no LHF, LHR e LHC. Todas correlações foram positivas e significativas, embora fracas, entre a variação de AD e VC em todos grupos (global, termo e prematuro) e todos modos e tempos de estocagem. **Conclusão:** O LHOC sofreu alteração nos valores de AD e VC, após submetido à refrigeração por 12 horas e ao congelamento por 15 dias. Entretanto, todos valores foram mantidos próximos aos valores originais do LHF, na forma de coleta e estocagem proposta nesta pesquisa, não comprometendo a sua administração ao RN. Esta pesquisa com 100 amostras de LHOC, pode ser considerada uma fonte viável como apoio científico e base de informação aos profissionais de saúde, na estratégia para nutrição dos RNPT e aos RN de risco e na otimização do uso do LHOC exclusivo de mãe ao filho.

Palavras-chave: Aleitamento materno. Prematuridade. Recém-nascido prematuro. Banco de Leite Humano. Controle de qualidade em BLH. Estocagem de Leite humano

ABSTRACT

The human milk is the natural and ideal food for premature and term newborns growth and development due its species-specific composition. Therefore, even in cases in which the newborn is unable to be naturally breastfed, the raw milk of newborn's mother may be collected and administered to the new born. **Aim:** to analyze the effects of distinct ways and times of milk storage on dornic acidity and energy content for raw human milk from neonatal care inpatient newborn's mothers. **Methods:** This is a prospective observational study and Cohort model was adopted for analytic purpose. A hundred human milk samples from 100 distinct donors were collected in the dependencies of the human milk bank in the mornings. Samples with at least 30 ml were separated in 3 equal portions after milk collection. The first fresh sample called fresh human milk (FHM) was immediately analyzed at room temperature, the second sample (refrigerated human milk - RHM) was analyzed after 12 hours of refrigeration ($\leq 5^{\circ}\text{C}$) and the third, frozen human milk (FroHM), after 15 days of freeze (between -18°C and -26°C). Milk acidity was determined by Dornic titration and milk energy content by the creatatocrit technique. **Results:** the donors group showed 28 ± 5 (from 16 up to 43) years old in average and $35,5 \pm 3,5$ (24 to 41) weeks of gestational age. Forty-nine donors had term parturition while 51 had preterm parturition. Lactation period at the time of milk collection varied between 2 up to 17 (average 6 ± 4) days. acidity analysis showed $2.8 \pm 0,9^{\circ}\text{d}$ in average for FHM and $3.1 \pm 0,9^{\circ}\text{d}$ for RHM and FroHM. The minimum values for acidity were 1.3°d for FHM, 1.6°d for RHM and FroHM, while maximum values were 4.4°d , 5.6°d and 4.7°d , respectively. The Dornic acidity measurements from FHM were statistically different from RHM and FroHM, but no differences were found between RHM and FroHM. For energy content determination, the average of $56.5 \pm 15,8$ Kcal/100 mL $55.8 \pm 4,1$ Kcal/100 mL and $55.9 \pm 14,2$ Kcal/100 mL were found for FHM, RHM and FroHM, respectively. The minimum values ranged from 39 to 124.1 Kcal/100 mL for FHM, from 39 to 116.6 Kcal/100 mL for RHM and from 39.2 to 116.1 Kcal/100 mL for FroHM. Significant difference was found between term and preterm groups for FHM ($p < 0.003$) when samples were grouped according to donor's gestational age. No significant difference was found for energy content among FHM, RHM and FroHM. Also, all correlations between DA and EC were positive, weak and statistically significant between tested groups within all evaluated conditions. **Conclusion:** The fresh human milk showed DA and EC variation when under 12 hours refrigeration and 15 days of freeze. Despite this variation, acidity and energy content values were close to the original values of FHM and within the acceptable range of values for milk administration to the newborns. Therefore, our work showed these methods of milk storage are safe and raw milk quality is maintained. Finally, these results may be an useful scientific resource for health professionals, supporting their decisions concerning to nutritional management of the raw human milk offered to the newborns and prematures and its exclusive use between mother and her newborn.

keywords: Breastfeeding. Prematurity. Preterm newborn. Human milk bank. Milk quality control. Human milk storage.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	MODELO OPERACIONAL DA REDEBLH	50
FIGURA 2 -	FLUXO DO LEITE NO BLH.....	54
FIGURA 3 -	CORES NORMAIS DO LEITE HUMANO – BLH-HC-UFPR	64
FIGURA 4 -	HIGIENE DAS MÃOS.....	83
FIGURA 5 -	HIGIENE DA MAMA, REGIÃO MAMILO-AREOLAR	84
FIGURA 6 -	ORDENHA MANUAL PELA DOADORA DA AMOSTRA	84
FIGURA 7 -	ORDENHA MANUAL REALIZADA PELO PROFISSIONAL	85
FIGURA 8 -	ORDENHA COM BOMBA ELÉTRICA.....	85
FIGURA 9 -	FLUXOGRAMA: PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ESTOCAGEM E ANÁLISES DE ACIDEZ DORNIC E CREMATÓCRITO.....	87
FIGURA 10 -	FRASCOS ESTÉREIS PARA GUARDA DAS AMOSTRAS NESTA FIGURA O MOMENTO DA AMOSTRA N.º 98.....	88
FIGURA 11 -	AMOSTRAS SOB DESCONGELAMENTO ANTES DA ANÁLISE.....	91
FIGURA 12 -	HOMOGENEIZAÇÃO DA AMOSTRA EM VORTEX.....	92
FIGURA 13 -	A COLETA DA ALÍQUOTA DE LEITE PARA TITULAÇÃO DA ACIDEZ	92
FIGURA 14 -	COLETA EM TRIPLICATA, 1 ML EM CADA TUBO DE ENSAIO	93
FIGURA 15 -	GOTEJAMENTO DE FENOLFTALEINA 1 GOTA EM CADA TUBO	93
FIGURA 16 -	TITULAÇÃO DE ACIDEZ DORNIC – GOTEJAMENTO DE NAOH	94
FIGURA 17 -	TITULAÇÃO DE ACIDEZ DORNIC - NAOH	94
FIGURA 18 -	PONTO DE EQUIVALÊNCIA: A VIRAGEM DA COR	95
FIGURA 19 -	AQUECIMENTO DAS ALÍQUOTAS PARA CREMATÓCRITO.....	96
FIGURA 20 -	ALÍQUOTA DE LEITE EM HOMOGENEIZAÇÃO.....	97
FIGURA 21 -	COLETA NO MICROCAPILAR EM TRIPLICATA	97
FIGURA 22 -	MICROCAPILAR COM LEITE ANTES DA CENTRIFUGAÇÃO.....	98
FIGURA 23 -	MICROCAPILARES EM TRIPLICATA, ANTES DA CENTRIFUGAÇÃO	98
FIGURA 24 -	MICROCAPILARES APÓS A CENTRIFUGAÇÃO.....	99
FIGURA 25 -	MICROCAPILARES APÓS A CENTRIFUGAÇÃO, RÉGUA MILIMÉTRICA	99
GRÁFICO 1 -	DISTRIBUIÇÃO DAS 100 DOADORAS DAS AMOSTRAS DE ACORDO COM A IDADE CRONOLÓGICA	103
GRÁFICO 2 -	DISTRIBUIÇÃO DAS DOADORAS DAS AMOSTRAS DE ACORDO COM A IDADE GESTACIONAL AO NASCIMENTO.	104

GRÁFICO 3 - DISTRIBUIÇÃO DAS DOADORAS DAS AMOSTRAS DE ACORDO COM O TEMPO DE LACTAÇÃO	105
GRÁFICO 4 - DISTRIBUIÇÃO DA FREQUÊNCIA DOS VALORES DA ACIDEZ <i>DORNIC</i> DO LHOC DE ACORDO COM OS TEMPOS E MODOS DE ESTOCAGEM, BANCO DE LEITE HUMANO, HC/UFPR, 2014	106
GRÁFICO 5 - DISTRIBUIÇÃO DA FREQUÊNCIA DO VALOR CALÓRICO DO LHOC DE ACORDO COM OS TEMPOS E MODOS DE ESTOCAGEM.....	107

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - NÚMERO TOTAL DE DOADORAS (n) SEGUNDO O MENOR VALOR OBSERVADO (MIN) E O MAIOR VALOR OBSERVADO (Max), MÉDIA, MEDIANA (Med), DESVIO-PADRÃO (DP) E INTERVALO DE CONFIANÇA (IC[95%])	108
TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO E TRATAMENTO ESTATÍSTICO DAS AMOSTRAS, DO LEITE HUMANO RELACIONADAS AO TEMPO DE NASCIMENTO (TERMO E PREMATURO) SEGUNDO AS VARIÁVEIS MATERNAS	108
TABELA 3 - DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE LHOC NO GRUPO GLOBAL E DAS AMOSTRAS SEPARADAS PELO TEMPO DE NASCIMENTO, PARA O GRAU DE ACIDEZ <i>DORNIC</i> ENTRE OS TRÊS MODOS E TEMPOS DE ESTOCAGEM EM CADA GRUPO	109
TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE LHOC NO GRUPO GLOBAL E DAS AMOSTRAS SEPARADAS PELO TEMPO DE NASCIMENTO, PARA O VALOR CALÓRICO ENTRE OS TRÊS MODOS E TEMPOS DE ESTOCAGEM EM CADA GRUPO	109
TABELA 5 - DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE LHOC RELATIVAS AO TEMPO DE NASCIMENTO, TERMO E PREMATURO, SEGUNDO A ACIDEZ E VALOR CALÓRICO EM CADA TEMPO E MODO DE ESTOCAGEM ENTRE OS DOIS GRUPOS.....	110
TABELA 6 - COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE SPEARMANN PARA VALORES DE ACIDEZ <i>DORNIC</i> E VALOR CALÓRICO NOS DIFERENTES MODOS E TEMPOS DE ESTOCAGEM EM CADA GRUPO	110

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AD	- Acidez <i>Dornic</i>
AGE	- Ácidos graxos essenciais
AGPL	- Ácidos graxos poliinsaturados
AM	- Aleitamento materno
AME	- Aleitamento materno exclusivo
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BLH	- Banco de Leite Humano
CEBLH	- Comissão Estadual de BLH
CNBLH	- Comissão Nacional de BLH
CRNBLH	- Centro de Referência Nacional de BLH
ECN	- Enterocolite necrosante
FIOCRUZ	- Fundação Oswaldo Cruz
HC	- Hospital de Clínicas
HCUFPR	- Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
IBERBLH	- Rede Iberoamericana de BLH
IG	- Idade gestacional
IHAC	- Iniciativa Hospital Amigo da Criança
LA	- Leite artificial
LH	- Leite humano
LHC	- Leite humano congelado
LHF	- Leite humano fresco
LHOC	- Leite humano ordenhado cru
LHOP	- Leite humano ordenhado pasteurizado
LHR	- Leite humano refrigerado
LM	- Leite materno
LME	- Leite materno exclusivo
NBCAL	- Norma Brasileira para Comercialização de Alimentos para Lactentes
OMS	- Organização Mundial da Saúde
OPAS	- Organização Pan-americana de Saúde
PCBLH	- Posto de Coleta de BLH
PNIAM	- Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento Materno

PNAISC	- Programa Nacional de Atenção Integral à Saúde da Criança
REDEBLH	- Rede Brasileira de BLH ou
rBLH-BR	- Rede Brasileira de BLH
RN	- Recém-nascido
RNEBP	- Recém-nascido de extremo baixo peso
RNMBP	- Recém-nascido de muito baixo peso
RNPT	- Recém-nascido prematuro
RNT	- Recém-nascido a termo
RPM	- Rotações por minuto
SAS	- Secretaria de atenção à saúde
SINASC	- Sistema de informação de nascidos vivos
SMAM	- Semana mundial de amamentação
UCinCa	- Unidade de cuidado canguru
UCinCo	- Unidade de cuidados intermediários e convencionais
UFPL	- Universidade Federal de Pelotas
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
UNICEF	- Fundo das Nações Unidas para Infância (<i>United Nations Children's Fund</i>)
UTIN	- Unidade de Terapia Intensiva Neonatal
VC	- Valor calórico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 OBJETIVOS	21
1.1.1 Objetivo primário	22
1.1.2 Objetivos secundários	22
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 O ATO DE AMAMENTAR E O LEITE HUMANO	23
2.1.1 Classificação e composição do leite humano	29
2.1.1.1 Os lipídios e as proteínas do leite humano	33
2.2 O RECÉM-NASCIDO PREMATURO - RNPT	37
2.2.1 Características morfofuncionais do RNPT e o leite humano	40
2.3 POLÍTICA DE ALEITAMENTO MATERNO NO BRASIL E A CRIAÇÃO DA REDE BRASILEIRA DE BANCO DE LEITE HUMANO (REDEBLH)	46
2.3.1 O Banco de Leite Humano	51
2.3.2 O fluxograma de funcionamento do BLH	53
2.3.3 Doadora de leite humano	54
2.3.4 O transporte do leite humano ordenhado	60
2.3.5 A recepção e estocagem do leite humano no BLH	61
2.3.6 O Degelo do leite humano ordenhado cru	62
2.3.7 Seleção e classificação do LHOC	63
2.3.7.1 Análise da sujidades, cor e odor (off-flavor)	63
2.3.7.2 A análise da acidez do leite humano	66
2.3.7.3 A análise do valor calórico do leite humano cru	71
2.3.8 O processo de pasteurização do LHOC	73
2.3.9 A análise microbiológica do Leite humano pasteurizado (LHOP)	75
3 MATERIAL E MÉTODOS	77
3.1 TIPO DE ESTUDO	77
3.2 LOCAL E PERÍODO DE ESTUDO	77
3.3 CASUÍSTICA	77
3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	78
3.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	79
3.6 POPULAÇÃO DE ESTUDO	79

3.7	AMOSTRA E TÉCNICA DE AMOSTRAGEM	79
3.8	HIPÓTESE DO ESTUDO	80
3.9	VARIÁVEIS DO ESTUDO.....	80
3.9.1	Variáveis dependentes	80
3.9.2	Variáveis independentes	80
3.9.3	Variáveis interferentes	81
3.10	PROCEDIMENTOS E MATERIAIS DO ESTUDO	81
3.10.1	Equipamentos, materiais e soluções usados na pesquisa	88
3.10.1.1	Análise da acidez do leite humano cru	88
3.10.1.2	Análise do valor calórico (crematócrito) do leite humano cru	89
3.10.1.3	Estocagem das amostras de leite humano cru	90
3.10.2	Procedimento para análise da acidez do leite humano cru	90
3.10.3	Procedimento para análise do valor calórico do leite humano	95
3.10.3.1	Obtenção do valor calórico de cada amostra	96
3.11	REGISTRO E GERENCIAMENTO	100
3.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	100
3.13	ÉTICA EM PESQUISA.....	101
3.14	MONITORIZAÇÃO DA PESQUISA	101
3.15	FOMENTO PARA PESQUISA.....	102
4	RESULTADOS	103
5	DISCUSSÃO.....	112
5.1	CARACTERÍSTICAS DAS DOADORAS DAS AMOSTRAS	112
5.2	O EFEITO DOS DIFERENTES MODOS E TEMPOS DE ESTOCAGEM SOBRE A ACIDEZ NAS AMOSTRAS DE LHOC.....	114
5.3	O EFEITO DOS DIFERENTES MODOS E TEMPOS DE ESTOCAGEM SOBRE O VALOR CALÓRICO DO LHOC	121
5.4	O EFEITO DOS MODOS E TEMPOS DE ESTOCAGEM SOBRE ACIDEZ E VALOR CALÓRICO NAS MOSTRAS DE LH SEPARADAS CONFORME O TEMPO DE LACTAÇÃO: A TERMO E PREMATURO	127
5.5	ANÁLISE DA CORRELAÇÃO ENTRE OS VALORES DE ACIDEZ E VALOR CALÓRICO DO LH NOS TRÊS MODOS E TEMPOS DE ESTOCAGEM	131
6	CONCLUSÃO	133
7	CONSIDERAÇÕES DO AUTOR	134

REFERÊNCIAS.....	136
PRODUÇÃO ACADÊMICA.....	164
REFERÊNCIAS.....	181
APÊNDICE.....	190
ANEXOS	200

1 INTRODUÇÃO

A qualidade de vida e o desenvolvimento dos recém-nascidos prematuros (RNPT) e recém-nascidos de termo (RNT), que necessitam de cuidados especiais, têm sido foco de preocupação nos últimos anos e, dentre os muitos aspectos relacionados aos cuidados especiais, a nutrição recebe grande atenção. Vários estudos apontam evidências científicas a respeito dos efeitos danosos aos recém-nascidos (RN) que não recebem leite materno, e abordam a importância do leite humano (LH) na nutrição destas crianças, com reflexos inclusive até na idade adulta (GROSS *et al*, 1980,1981; AKRÉ, 1997; KING, 1998; ALMEIDA, 1999a; GIUGLIANI, 2000; KOLETZKO *et al.*, 2001; VINAGRE, 2001; WEBER *et al*, 2001; SIMPSON; SCHANLER; LAU, 2002; CALIL; FALCÃO, 2003a; DIJCK-BROUWER *et al.*, 2005; MORGANO *et al.*, 2005; HART *et al.*, 2006; MASTROENI *et al.*, 2006; MARGOTTO, 2006; TINOCO *et al*, 2007; WHO, 2007; ROBLEDO E ROMERO; 2008; GUTIERREZ; PANCHULA, 2010; MOURA, 2010). Este conhecimento levou ao estímulo do uso do LH nas Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN).

A Organização Mundial da Saúde (OMS, 2003; WHO, 2007) define o LH como o alimento mais completo para a criança e recomenda o aleitamento materno (AM) exclusivo até seis meses de idade, que deverá ser complementado até os dois anos ou mais.

A Academia Americana de Pediatria (AAP, 2012) considera o leite materno a primeira opção para a nutrição de recém-nascidos, prematuros ou a termo, nos primeiros seis meses de vida, em função de sua digestibilidade, composição química balanceada e capacidade de gerar imunidade, com benefícios reconhecidos cientificamente (AKRÉ, 1997; KING, 1998; ALMEIDA, 1999a; GIUGLIANI, 2000; UAUY *et al.*, 2001; LAWOUNIER; VIEIRA.; GOUVEA, 2002; DINIZ; COSTA, 2003; VIEIRA *et al.*, 2004; RIBEIRO; KUZUHARA, 2007; OMS/UNICEF, 2009; ALMEIDA, 2010; MOURA, 2010; AGARWAL *et al.*, 2011).

A OMS e o Fundo das Nações Unidas para a Infância (OMS/UNICEF, 2009) apontam que é um dever dos profissionais de saúde, a orientação à mãe como começar e manter a lactação nas situações em que existe o impedimento do RN sugar ao seio materno. Há a possibilidade de fornecer o leite materno ordenhado cru por meio de copinho, colher ou tubo, ou o leite distribuído pelos Bancos de leite

Humano (BLH) (ALMEIDA, 1999a; MARINELLI; BURK; DODD, 2001; OMS/UNICEF, 2009; REINAUX, 2010; SETE *et al.*, 2010).

Nesta perspectiva, diversas pesquisas apontam que as crianças prematuras alimentadas com leite da própria mãe apresentam velocidades de crescimento maiores do que aquelas alimentadas com leite de BLH. Embora os RNPT apresentem necessidades nutricionais maiores, proporcionalmente à maior velocidade de crescimento, o leite das mães de RNPT apresenta maior teor de proteínas, sódio, cloretos, magnésio e ferro do que o LH de mãe de parto a termo e de doadoras de BLH (SCHANLER, 1995; AKRÉ, 1997; VINAGRE, 1999; 2001; DINIZ; COSTA, 2003; MARGOTTO, 2006; RAMOS, 2008; CARVALHO; TAVARES, 2010). Também porque o LH processado em BLH pode apresentar menor taxa calórica e não atender integralmente as necessidades nutricionais do RNPT (MORLEY; LUCAS, 2000; VIEIRA *et al.*, 2004).

Segundo os relatórios anuais da Rede Brasileira de Banco de Leite Humano (rBLH-BR) (PORTAL DA REDEBLH, 2013), em relação à doação do LH, há o predomínio do leite doado por mulheres com parto a termo e com mais de 15 dias de pós-parto, ou seja, a maior doação é de LH maduro. Alguns autores concordam que o LH de BLH pode não satisfazer integralmente as necessidades dos RNPT, embora seja ótima opção na falta do leite exclusivo da própria mãe (AKRÉ, 1997; JENSEN, 1999; NASCIMENTO; ISSLER, 2004; OMS/UNICEF, 2009; ALMEIDA, 2010). As mães com parto prematuro produzem LH com composição diferenciada, adequada ao RNPT em termos de conteúdo calórico-energético e imunológico, por ser um alimento com composição mais próxima ao que seria oferecido pela nutrição intra-útero (AKRÉ, 1997; ALMEIDA, 1999a; VINAGRE, 2001; MORLEY; LUCAS, 2000; VINAGRE; DINIZ, 2002).

Para esta pesquisa, foi indispensável discorrer sobre LH, sua composição e classificação; sobre as características morfofuncionais dos RNPT, sua relação com o LH, sobre o funcionamento do BLH, como também sobre os fatores que podem alterar o valor original da acidez (AD), o valor calórico (VC) e suas consequências na nutrição do RN. Enfatiza-se que a metodologia utilizada seguiu os fundamentos da rBLH-BR, suas normas e rotinas padronizadas, as técnicas de processamento para a manipulação do LH ordenhado cru, com certificação quanto ao controle de qualidade e adaptados à realidade brasileira em conjunto com a ANVISA (2008).

O LH doado ao BLH passa por controle rigoroso e análises específicas, cujo objetivo é assegurar a sua qualidade (BRASIL, 2004; SILVA, 2004; SCARSO, 2008).

A titulação da acidez pelo método de *Dornic*, uma das técnicas usadas nesta pesquisa, é a análise seletiva e classificatória que identifica o grau de acidez do leite humano ordenhado cru (LHOC). É de fácil execução, rápida, de baixo custo, e destaca-se entre os parâmetros de controle de qualidade do LH em BLH (GALHARDO; ARAUJO; BORG, 2002).

O crematócrito é a outra técnica para avaliar a qualidade do LH. Trata-se de um micrométodo rápido que determina a quantidade de creme, estima a concentração de gordura e possibilita a análise classificatória, que identifica o valor calórico da amostra do LH. O método recomendado e usado pela rBLH-BR é o proposto por Lucas e colaboradores criado em 1978 (ANVISA, 2008; PORTAL DA REDEBLH; 2013).

Ambas técnicas de análise de LH citadas mostram os valores originais e as alterações que o LH pode sofrer, principalmente se não for coletado e conservado nas condições de higiene e estocagem adequadas (MAYANS; MARTELLI, 1994; 1999; MEIER *et al.* 2002; VIEIRA *et al.*, 2004; CAVALCANTE *et al.*, 2005; GUIMARÃES; NOVAK, 2005; BRASIL, 2008; SEVERINE *et al.*, 2008; GRAZZIOTIN; GRAZZIOTIN; LETTI, 2010).

Alguns hospitais que possuem o título de "Amigo da Criança" (OMS/UNICEF, 2009) e o método Canguru, utilizam o LH cru, exclusivo da própria mãe para os RNPT, e mostraram bons resultados (VINAGRE; DINIZ, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2010; BRASIL, 2011). Porém, na maioria dos hospitais do Brasil, não é comum o uso do leite materno cru exclusivo ao bebê que necessita de cuidados especiais em uma UTIN (SETE *et al.*, 2010) e quando o LH da própria mãe é utilizado, só é feito na hora marcada para o RNPT ser alimentado, não é estimulada a ordenha de maiores volumes para serem estocados e oferecidos em outros horários, nos quais a mãe não esteja presente no Hospital. Há hospitais que nem mesmo utilizam esta prática.

Estas observações foram constatadas por mim, durante os vários anos de atuação em Banco de leite Humano, através da demanda por parte de profissionais da saúde, gerentes, administradores de hospitais, interessados em conhecer os procedimentos para implantação de ações em AM, e por ocasião de minhas visitas às instituições hospitalares, como avaliadora do Ministério da Saúde para o programa da Iniciativa Hospital Amigo da Criança (IHAC), como instrutora em cursos de capacitação ou assessoria na implantação de programas em AM.

Também pude observar que muitas mães não podem estar 24 horas junto ao seu RNPT internado, devido os mais variados motivos, como a falta de

acomodações que a mantenham próxima do RNPT, a responsabilidade pelo cuidado com outros filhos, a necessidade de continuar trabalhando, fatos esses que dificultam a obtenção de seu leite em todos horários (GRAZZIOTIN; GRAZZIOTIN; LETTI, 2010). A qualidade do LH ordenhado e ofertado cru exclusivo é um desafio. Primordial é a segurança contra o perigo de contaminação e não causar dano aos receptores. Trata-se de uma questão de saúde pública no Brasil, que não dispõe de número suficiente de BLH para atender a demanda.

Médicos, nutricionistas, enfermeiros, Fonoaudiólogos, técnicos, todos os profissionais cujas preocupações referem à qualidade nutricional do LH e à possibilidade de causar infecções aos RNPT, podem utilizar a presente pesquisa para obtenção de mais informações sobre o manejo de LHOC, exclusivo de mães com RN internados numa Unidade de Neonatologia, e aplicar na prática, de forma adequada, com qualidade e segurança, conscientizando-se sobre os cuidados na coleta, estocagem, preparação e administração do LHOC.

Acredita-se que uma das razões para o não aproveitamento do LME cru estocado, é a falta de conhecimento e de capacitação dos profissionais com o manejo do LME ordenhado cru, nas instituições que não possuem BLH, levando ao impedimento, restrições ou atrasos na amamentação para muitas mães e suas crianças. Diante disto, decidi por este estudo, para obter-se mais uma fonte de apoio científico aos profissionais de saúde da área de Neonatologia, na prática com o manejo do leite materno cru, de uso exclusivo, mostrando quais são os efeitos sobre sua AD e VC, quando submetido a diferentes tempos e modos de estocagem, até ser administrado aos RN.

1.1 OBJETIVOS

Esta pesquisa procurou esclarecer os seguintes questionamentos: ocorrem alterações significativas nos valores de acidez original e no valor calórico do leite humano ordenhado cru, após submetido à refrigeração por 12 horas e ao congelamento por 15 dias, quando comparado aos seus valores no modo fresco e tempo zero? Se ocorrem alterações, estas comprometerem a qualidade do LH que impeçam o seu fornecimento ao RN?

1.1.1 Objetivo primário

Analisar o efeito dos diferentes modos e tempos de estocagem sobre o grau de acidez e o valor calórico do leite humano ordenhado cru fresco e submetido à refrigeração por 12 horas e ao congelamento por 15 dias.

1.1.2 Objetivos secundários

- a) Avaliar se os valores de acidez e o valor calórico do LHF sofrem alteração devido à estocagem sob refrigeração por 12 horas e ao congelamento por 15 dias;
- b) Analisar se a variação do grau de acidez possui relação com a variação do valor calórico nas amostras do LH nos diferentes tempos e modos de estocagem;
- c) Identificar se os valores de acidez observados, estão dentro dos limites aprovados para consumo conforme o Manual de Normas e Rotinas em BLH, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2008).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O ATO DE AMAMENTAR E O LEITE HUMANO

No momento em que uma criança nasce, ela deixa o conforto e a segurança que havia no útero materno e entra para um novo mundo. Tudo será diferente a partir deste momento. Muitos estímulos e novas necessidades. Manter o vínculo com sua genitora, com seu novo ninho, é fundamental para que consiga se sentir acolhido, ter um desenvolvimento físico e psicológico saudável. O cordão umbilical é cortado para que a nova vida aconteça, mas um novo elo deve ser seguido: o vínculo da mãe com a criança. Na espécie mamífera, a amamentação materna segue após a vida intra-uterina, como a continuidade da gestação, um ato muito próximo após o nascimento entre a mãe e a criança.

O ato de amamentar é essencial para a formação deste vínculo, incomparável benefício à mãe e à criança, envolvendo-os num contato íntimo, talvez o mais íntimo possível, após o nascimento (REGO, 2008). Sabe-se também que o LH, enquanto produto alimentar, é comprovadamente a melhor fonte energética, calórica, imunomoduladora e nutritiva para o crescimento e desenvolvimento físico, neurológico, e aliada à atitude que a mãe realiza ao oferecê-lo durante a mamada, também reflete no desenvolvimento emocional e psicológico da criança (ALMEIDA, 1999a; UAUY *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2007; REGO, 2008; GUTIÉRREZ; PANCHULA, 2010).

O contato físico da mãe com seu filho(a), através do ato de amamentar, promove a transferência de imunidade materna para o recém-nascido, como uma transfusão imunológica, através do ciclo entero-brônquico-mamário, resultado de toda uma vida de contatos que a mãe teve até aquele momento, ingerindo, respirando, tocando no meio ambiente em que ela vive e, involuntariamente tendo contato com antígenos, o que estimula seu organismo a produzir anticorpos, que migram para suas glândulas mamárias e passam ao leite e ao seu filho(a) (ALMEIDA, 1999a).

Amamentar é uma maneira inigualável de prover o alimento ideal para o crescimento e o desenvolvimento sadio das crianças e constitui uma base biológica e emocional única para mãe e filho (OMS/UNICEF, 2009). Além disto, há os benefícios econômicos para família que não necessita adquirir leites artificiais para suprir as

necessidades decorrentes da prática do desmame precoce (OMS/OPAS, 2001; WHO, 2001; RAMOS; ALMEIDA, 2003).

Pesquisas atuais referentes às diversas formas de ação e suas consequências para saúde infantil, mostram que o aleitamento materno (AM) é a intervenção isolada em saúde pública que apresenta o maior potencial para a diminuição da morbimortalidade infantil (TOMA; REA, 2008). Entre as estratégias de promoção de saúde infantil da OMS, destaca-se o incentivo ao aleitamento materno cuja prática recomendada é o aleitamento materno exclusivo (AME), como a única fonte de alimento para praticamente todos os lactentes até seis meses de idade (OMS/OPAS, 2001; DEVINCENZI *et al.*, 2007). Após esta idade, o AM deve ser mantido, acrescido dos alimentos complementares nutricionalmente adequado e culturalmente apropriados, até os dois anos ou mais (OMS/OPAS, 2001), pois assegura a melhor qualidade em saúde e proporciona às crianças um melhor desempenho nas etapas seguintes da vida (TOMA; REA, 2008).

A OMS (2009) e o UNICEF salientam que a amamentação consiste na melhor estratégia em situações de emergência, tais como inundações, incêndio, outras catástrofes naturais, uma vez que as crianças menores são mais vulneráveis às intercorrências do ambiente (MOURA, 2010).

A Academia Americana de Pediatria (AAP, 2012) refere que o AM teria uma ação protetora contra a síndrome da morte súbita do lactente, o diabetes tipo 1, a doença de *Crohn*, a colite ulcerativa, o linfoma, as doenças alérgicas e outras doenças crônicas do sistema digestório.

As pesquisas e a prática nos 5 anos desde a publicação da última declaração de política AAP reforçaram a conclusão de que o AM e o uso de LH confere benefícios nutricionais exclusivos para o bebê [...] Recentemente, estudos baseados em evidências publicadas confirmaram e quantificam os riscos de não amamentar. Assim, a alimentação infantil não deve ser considerada como uma opção de vida, mas sim como uma questão de saúde básica. Como tal, o papel do pediatra na defesa e apoio a práticas adequadas de amamentação é essencial e vital para a consecução desta meta prioritária em saúde pública (AAP, 2012, p. 837, tradução nossa).

Segundo o Protocolo Clínico n.º 16, da *Academy of Breastfeeding Medicine* (ABM, 2007), a amamentação ajuda a desenvolver melhor coordenação da linguagem e ainda cita:

[...] os estudos indicam também que a amamentação trás vantagens neurocognitivas positivas, mais pronunciada em crianças com baixo peso ao nascer e menor idade e que podem ter oito pontos a mais nos testes de inteligência quando comparados aos seus homólogos alimentados com leite artificial. Como os bebês hipotônicos podem ter outras desordens associadas à deficiência neurológica, o benefício do leite materno poderia marcar a diferença a longo prazo. As crianças com enfermidades cardíacas congênitas que tem sido amamentadas, tem crescido melhor, tem tido menor tempo de internação hospitalar e saturação de oxigênio mais altas do que bebês alimentados com fórmulas. Novamente este pode ser um benefício potencial para bebês hipotônicos com enfermidades cardíacas, algo que se vê numa proporção significativa de bebês com Síndrome de *Down*. Embora não haja estudos específicos em crianças com Síndrome de *Down* e outras formas de hipotonia, baseados na abundância de informações sobre a população em geral, pode-se esperar benefício do aleitamento com leite extraído (ABM, 2007 – tradução nossa).

Na literatura encontram-se as expressões "Leite Humano" e "Leite Materno" sendo utilizadas sem diferença de conceituação entre as mesmas, ou seja, com o mesmo significado, como poderemos observar nas referências que seguem neste parágrafo: A AAP (2012) considera o leite materno a primeira opção para a nutrição de recém-nascidos, prematuros ou a termo, nos primeiros 6 meses de vida, em função de sua digestibilidade [...] é unânime em recomendar e reconhecer o 'leite humano' como o melhor alimento para o bebê a termo, assim como para o bebê prematuro, inclusive para os de muito baixo peso.

Gutiérrez e Panchula (2010) e Aprile et al.(2010) referem-se ao 'leite materno' como o alimento considerado padrão ouro para nutrição dos RN, com base no crescente número de evidências epidemiológicas que mostram a importância do aleitamento materno, não só como questão de sobrevivência, mas de qualidade de vida. Outros autores enfatizam a importância do 'leite humano' para os RNPT, devido aos nutrientes específicos que ajudam na maturação, os fatores proteção contra infecções gastrointestinais, respiratórias e urinárias reduzindo a mortalidade infantil, favorecendo o desenvolvimento cerebral e estimulando ativamente o sistema imune de todos recém-nascidos, e não tendo sucedâneo adequado capaz de substituí-lo (GIUGLIANI, 2000; RICCO; DEL CIAMPO; ALMEIDA, 2000; REGO, 2002; CALIL; FALCÃO, 2003b; RAMOS; ALMEIDA, 2003; MARGOTTO, 2006).

Diversos estudos mostram que doenças inflamatórias intestinais são mais comuns em crianças não amamentadas em comparação com aquelas que foram. Mas explicar por que isso acontece tem sido difícil. Recentemente, Charlotte Katzel e colegas da Universidade do Kentucky deram mais um passo na demonstração do mecanismo desse fenômeno, além do que qualquer outro grupo já havia feito. Eles demonstraram que um anticorpo

(SIgA – IgA Secretora) transmitido pelo leite materno da mãe para o bebê altera a expressão de genes nas células epiteliais do intestino do lactente. Esses genes estão associados ao desenvolvimento de Síndrome de Intestino Irritável e estas mudanças parecem durar até a vida adulta. [...] De qualquer modo, esse trabalho adiciona mais peso a recomendação geral que o leite materno é melhor: ele simplesmente dá aos profissionais de saúde mais um motivo do porquê (CARVALHO, 2014).

Profissionais especialistas em lactação tem usado o termo 'leite materno' quando se referem ao leite da própria mãe doado ao seu filho(a) como cita Carvalho (2001, 2011) "melhor que o leite humano é o leite materno!" fazendo distinção no significado de cada termo.

O saber científico comprovou que o LH tem um potencial preventivo sobre a saúde, com vantagens sobre o aleitamento artificial seja fornecido diretamente pelo ato de mamar ou extraído para ser oferecido aos RNPT que não apresentam condições para sugar (NEWMANN, 1995; KENNER, 2001; WHO, 2003; 2007; GUTIERREZ; PANCHULA, 2010). No Manual Brasileiro de Capacitação em Atenção Humanizada ao Recém-Nascido de Baixo Peso, Método Canguru, Brasil (2011) é reforçado que o leite materno é a melhor opção para o RNPT, pois supre suas necessidades, contém mais proteínas, lipídios e calorias se comparado ao leite de mães de RNT e, portanto, deve ser o alimento de escolha (GORGULHO; PACHECO, 2008).

O LH fornece energia e nutrientes necessários nas quantidades apropriadas e o ideal é que o RNPT receba o leite de sua própria espécie (AAP, 2005;2012; REA, 1998; REGO, 2002), o qual pode ser ofertado através de um BLH, embora o LH mais adequado seja o leite de sua própria mãe, por apresentar composição de acordo com suas necessidades imunológicas, fisiológicas e nutricionais (NASCIMENTO; ISSLER, 2004).

O LH é um fluido complexo, que contém proteínas, lipídios, carboidratos, vitaminas, minerais, substâncias imunocompetentes como as imunoglobulinas, interferon, enzimas, além de fatores tróficos, moduladores do crescimento (ALMEIDA, 1999a; DIJCK-BROUWER *et al.*, 2005; COSTA; SABARENSES, 2010; PASSANHA *et al.*, 2010). Para muitos autores, o LH é muito mais do que uma coleção de nutrientes, é uma substância viva, de grande complexidade biológica, protetora, imunomoduladora, que estimula o desenvolvimento do sistema imune, a maturação do sistema digestório e neurológico, e melhora da acuidade visual (ALMEIDA, 1999a; UAUY *et al.*, 2001; LAMOUNIER; VIEIRA; GOUVEA, 2002; HART *et al.*, 2006) e contem fatores

de proteção contra infecções virais e bacterianas. As reações alérgicas são raras com seu uso (LUCAS; COLE, 1990; REGO, 2002). O LH possui fatores de proteção contra cólera e infecções intestinais causadas por *Escherichia coli enteropatogênica*, rotavírus, e contra *Campilobacter jejuni*, *Giardia lamblia* (TERUYA; COUTINHO, 2001), induz à imunidade local no trato urinário (NEWMANN, 1995), reduz a incidência de otite média (VERNACCHIO *et al.*, 2004), de bronquiolite (BACHRACH; SCHWARZ.; BACHRACH, 2003) e de asma (HANSON, 1998).

Estudo clássico realizado no Brasil por Victora e colaboradores em 1987, em Pelotas, constatou que o risco de óbito por diarreia em crianças desmamadas é 14,2 vezes maior do que o de crianças em AM sem suplemento lácteo (VICTORA, 2009).

Almeida (1999a) refere-se a uma dinâmica da constituição dos atributos de qualidade do LH, as quais interligam a sua composição ao universo da biologia do lactente. Segundo ele, as propriedades químicas, nutricionais, imunológicas, microbiológicas, físicas e fisiológicas do LH são o reflexo das necessidades do lactente. Akre (1997) refere que o LH não é apenas uma fonte de nutrientes adaptados à capacidade metabólica do bebê, mas que o mesmo é capaz de exercer controle sobre o metabolismo que vai desde a sutileza das divisões celulares até o comportamento do bebê.

Para Diniz e Costa (2003), a riqueza de fatores imunitários, a especificidade dos aminoácidos, a presença dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa já capacitam o uso do leite materno ao prematuro, como o elegem para o RN de termo. Donovan e Odle (1994), Makrides *et al.* (1995), Koletzko *et al.* (2001) salientam a presença de hormônios, oligossacarídeos e ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, que podem influenciar no crescimento e maturação cerebral, como o ácido docosahexaenóico, importante para o sistema nervoso do RN e se encontra abundante no cérebro e na retina. Birch *et al.* (1992), Makrides *et al.* (1993; 2000); Carlson *et al.* (1993) citam que há melhor score em testes visuais realizados com crianças em AM.

O'Connor *et al.* (2001) e Goulart e Rozolen (2004) também reforçam que a rica fonte de ácidos graxos essenciais do LH é essencial para o desenvolvimento cerebral das crianças prematuras e pode aumentar a maturação precoce da função visual e o processamento da informação.

Apesar deste conhecimento científico acumulado, há ainda muita discussão sobre a capacidade do LH suprir as necessidades nutricionais dos prematuros,

especialmente os de muito baixo peso (<1.500gramas) e de extremo baixo peso (<de 1.000 gramas). Alguns autores afirmam que, com o uso de leite materno exclusivo, podem não ser atingidos os objetivos esperados para o crescimento e desenvolvimento, quando comparados aos prematuros que recebem fórmulas especiais ou leite materno acrescido de aditivos (SCHANLER, 2001; EDMUND; BAHL, 2006;;BOYD;QUIGLEY;BROCKLEHURST, 2007). Trabalhos científicos revelam que LM exclusivo apresenta insuficiência de alguns nutrientes ao RNPT como a proteína, o cálcio, o fósforo e a energia em relação as suas necessidades para manutenção e crescimento adequado (RAMOS, 2008). Porém, existem relatos de experiências com melhor ganho de peso em prematuros com o uso de leite fresco, cru, da própria mãe (SIMPSON; SCHANLER; LAU, 2002) e com o uso do leite posterior que apresenta maior teor de gordura (VALENTINE *et al.* 1994; ALMEIDA, 1999b; SILVA *et al.* 2007). Não seria uma quantidade menor de alguns nutrientes que impediria o seu uso aos RNPT (DINIZ; COSTA, 2003).

Como relata Soares (2011), sobre avaliação do gasto energético e da utilização de macronutrientes pelos RNPT alimentados com LH ou fórmula LA, o uso da fórmula láctea para estas crianças (com valor calórico em média de 81 Kcal/100mL) apresentou uma melhor resposta metabólica do que o LH de doadoras (valor calórico médio foi de 58 Kcal/100mL). No entanto, quando ofertado o LH com acréscimo de aditivo, obteve-se maior valor calórico e a diferença na resposta metabólica desapareceu, o que estimula a sua prática e reforça a necessidade de um maior controle e busca por um LH de maior valor calórico.

O conhecimento sobre o LH como alimento, nas suas várias especificidades e classificação, é fundamental para que se possa utilizar esta forma de nutrir com segurança e com menor risco possível à saúde e desenvolvimento dos RN. É preciso conhecer as melhores condições de manejo do LH e o uso de técnicas adequadas para que seja oferecido a um ser já tão fragilizado, que ainda não tem condições de sugar diretamente em sua mãe. A opção de sua alimentação requer cuidados rigorosos, visando a minimização de riscos. A decisão em usar o leite da própria mãe, ordenhado cru, requer rigor na técnica de manejo e não é livre de riscos de contaminação microbiológica, sujidades e por esta razão devem ser considerados cuidadosamente o todo o meio ambiente que o envolve e os conhecimentos específicos disponíveis, além da apropriação destes conhecimentos pela equipe que atende ao binômio.

2.1.1 Classificação e composição do leite humano

O LH é constituído por substâncias que não podem ser reproduzidas, como os fatores de crescimento, hormônios, fatores imunológicos, enzimas, o tipo do glóbulo de gordura. Apresenta variações em sua concentração e constituição que se modificam ao longo do tempo de lactação e parecem corresponder às mudanças das necessidades do RN (ANDERSON, 1985; LAMOUNIER; LEÃO, 2008). Cada espécie mamífera produz um leite com características para satisfazer as necessidades de sua espécie, portanto é o LH, o mais apropriado ao metabolismo da criança.

Ao se observar uma gota de leite humano ao microscópio, duas estruturas muito bem definidas saltam aos olhos. A primeira consiste em um número muito grande de pequenos glóbulos amarelados regularmente distribuídos por todo o produto, e a segunda, em grandes bolas brancas que parecem estar flutuando em seu interior. Trata-se de glóbulos de gordura e micelas de caseína, respectivamente emulsificadas e dispersas em um meio que, por analogia ao sangue, corresponde ao que pode ser chamado de soro do leite. Em verdade, o leite humano é uma mistura homogênea que se estrutura na forma de um sistema, composto por três subsistemas ou fases, assim definidos: fração emulsão – glóbulos de gordura; fração suspensão – micelas de caseína; e fração solução – constituintes hidrossolúveis (ALMEIDA, 1992 *apud* ALMEIDA, 1999a, p.64).

Para o uso mais adequado do LH, é importante que se conheça a sua composição e os vários fatores que determinam as suas variações, tais como o estágio da lactação, a idade gestacional, as fases do LH no curso de uma mesma mamada, do intervalo entre as mamadas, ao longo do dia, a forma de esvaziamento das mamas, o grau de pressão utilizado para extrair o leite, o intervalo entre as gestações e a ingestão de álcool e drogas.

O seu componente mais variável é a gordura, a principal fonte calórica do LH, que ao final da mamada pode alcançar uma média de $964,6 \pm 215,9$ Kcal por litro, de até três vezes ou mais que o leite anterior (ALMEIDA, 1999a; HEIMAN; SCHANLER, 2006; LAMOUNIER; LEÃO, 2008; VIEIRA *et al.*, 2011). O LH pode também sofrer influência de fatores hereditários, alimentares, imunológicos, ambientais e emocionais (STRIKER *et al.*, 2004; CUNHA; COSTA; ITO, 2005; YAMAWAKI *et al.*, 2005; MACIAS; RODRIGUES; RONAYNE, 2006; PATIN *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2007; MacCHIAVERNI *et al.*, 2008; REGO, 2008).

Kent *et al.* (2006) avaliaram a relação entre o número de mamadas por dia e o conteúdo total de gordura do LH. Foram acompanhadas 71 nutrízes com bebês de 1 a 6 meses de vida e os autores encontraram valores do conteúdo de lipídios entre 2,23 a 6,16g/dL de leite com variações entre as mamadas e durante a própria mamada. Concluíram que os bebês ingerem cerca de 67% do volume total do leite da mama e que a quantidade de lipídios ingeridos não depende da frequência das mamadas. Nascimento e Issler (2004) em um estudo de revisão da literatura, citam que a ingesta de maior porcentagem de gordura (lipídios) está na dependência da duração da mamada na mesma mama até que a criança termine espontaneamente de sugar.

Conforme Silva (2008), a classificação do LH é feita de três maneiras:

- a) Conforme a idade gestacional: leite de mãe de RNT e RNPT;
- b) Conforme o período de lactação: leite pré-termo ou leite prematuro (idade gestacional inferior a 37 semanas); colostro (de 1 a 7 dias pós-parto a termo); leite de transição (de 8 a 14 dias após o parto a termo) e leite maduro (a partir de 15 dias de parto a termo) (EUCLYDES, 2005).
- c) Conforme a duração da mamada: leite anterior (início da mamada), leite intermediário (meio da mamada) e leite posterior (final da mamada).

Já King (1998) classifica o LH quanto ao tempo de lactação após o nascimento, em colostro (leite dos primeiros dias) e leite maduro (após uma ou duas semanas) e quanto à duração de uma mamada, como leite do começo e leite do fim.

O colostro é a primeira secreção que as glândulas mamárias produzem ainda na gestação, e nos primeiros dias após parto, e apresenta um volume variável de 2 a 20 mL por mamada, nos três primeiros dias, podendo variar de 10 a 100mL por dia, sendo diferente para cada mulher. O leite de transição ocorre na segunda semana e é como uma ligação entre a transformação do colostro em leite maduro, com modificações de forma gradual e progressiva. A produção láctea vai sendo estimulada pela sucção da criança e o ato repetitivo estimula a liberação de prolactina e influencia na duração da lactação. O volume do leite tende a aumentar gradativamente conforme a frequência e intensidade da sucção do RN (ANDERSON, 1985; KING, 1998; ALMEIDA, 1999a; LAWRENCE; LAWRENCE, 2005; LAMOUNIER; LEÃO, 2008; SILVA, 2008).

O leite pré-termo ou leite precoce (como também é chamado o leite prematuro) é especialmente recomendado para crianças prematuras, pois ele difere daquele

produzido depois de uma gestação completa. As mães de crianças prematuras produzem um leite com uma composição proteico-calórica e de componentes imunológicos diferentes para atender às necessidades únicas e fisiológicas do prematuro, que não recebeu as imunoglobulinas via placenta, as quais passam com mais intensidade a partir da 34.^a semana de gestação. Nas duas primeiras semanas depois do parto, o LH prematuro contém mais calorias, maiores concentrações de gordura, proteína e sódio e menor concentração de lactose, cálcio e fósforo do que o leite de termo e uma composição mais próxima ao colostro nas quatro primeiras semanas (GROSS; GELLER; TOMARELLI, 1981; BARROS *et al.*, 1984; HAMOSH, 1996; MORLEY; LUCAS, 2000; VINAGRE, 2001; VANNUCHI *et al.*, 2004; ALVES; SILVA; OLIVEIRA, 2007; ALMEIDA, 2010).

Barros *et al.* (1984), Feferbaum, Quintal e Araujo (2003) relatam que, quanto maior a prematuridade, maior o teor de gordura e de proteína do LH e apontam que a relação proteínas do soro/caseína garante uma alta digestibilidade devido à formação do coágulo fino que permanece pouco tempo no estômago e facilita o esvaziamento gástrico.

O colostro apresenta-se espesso, viscoso e de cor amarelada associada a seu elevado teor de carotenóides, incluindo alfa-carotenóides, beta caroteno e beta criptoxantinas. Apresenta conteúdo energético em torno de 58 Kcal/100mL, menor em comparação ao LH maduro, cuja média é de 71 Kcal/100mL (LAMOUNIER; VIEIRA; GOUVEIA, 2002; CALIL; FALCÃO, 2003a). O colostro contém maior teor de minerais como sódio, potássio, cloro, zinco especialmente, vitaminas lipossolúveis incluindo A, E, K e mais proteínas. No entanto, menor teor de gordura, carboidratos, de vitaminas hidrossolúveis (OLIVEIRA, 2003; EUCLYDES, 2005; MASTROENI *et al.*, 2006).

O colostro é rico em anticorpos que protegem os RN contra infecções, e possui a propriedade de facilitar o estabelecimento de uma microbiota intestinal predominantemente composta por *Bifidobacterium*, com efeito laxativo sobre o mecônio (AKRÉ, 1987; KOUTRAS; VIGORITA, 1989; KING, 1998; REGO, 2002). Sua concentração elevada de imunoglobulinas e outros fatores de proteção faz com que seja considerado uma "prescrição médica" da natureza, além de alimento natural, bem adaptado às necessidades do RN, que apresenta seus rins ainda imaturos o que impedem de processar grandes volumes de leite (AKRÉ, 1997).

Segundo Agarwal *et al.* (2011), as propriedades anti-infecciosas e protetoras do colostro se mantém ao longo de todo período de lactação, embora estejam em

menor quantidade no leite maduro em relação ao colostro, a exemplo do interferon, algumas citocinas e a imunoglobulina IgA secretora que é a sua principal imunoglobulina, conhecida como o anticorpo de mucosa.

A IgA, na sua forma dímera, é fortemente resistente à degradação, é produzida na glândula mamária, oferece grande proteção à mucosa do aparelho digestivo e vias respiratórias, revelando que o leite materno não beneficia somente o RNPT nos primeiros dias de vida (LOUZADA; SOLLA, 1997), como também durante todo tempo de aleitamento, com vantagens imunológicas para os bebês que mamam no segundo e terceiro anos de vida (OMS/OPAS, 2001).

O LH de transição possui mais lactose, mais gordura, mais calorias, e menos imunoglobulinas e proteínas totais quando comparado ao colostro (AGARWAL *et al.*, 2011; ORSHAN, 2010). Já o LH maduro, que consiste numa mistura homogênea de três frações, a solução, a primeira que sai da mama ao ser ordenhada, contém os componentes hidrossolúveis, mais lactose (7g/100mL), mais água e imunoglobulinas; a segunda fração, é uma suspensão que contém maior quantidade de cálcio, fósforo, proteínas; e a terceira fração, é a emulsão, conhecida como o leite posterior da mama, com maior teor de gordura (4g/100mL), mais energia e conteúdo protéico (1,1 a 1,8g/100mL) quando comparado ao leite de transição (KUNZ; LONNERDAL, 1992; SILVA *et al.*, 2007; ORSHAN, 2010).

Para Almeida (1999a), que classifica o LH quanto à duração da mamada, o primeiro leite, chamado de leite anterior, flui da mama logo que a criança começa a sugar, ou que é ordenhado por durante aproximadamente 5 a 10 minutos. Este leite do começo da mamada (fração solução) é composto predominantemente por elementos hidrossolúveis; contém mais água, menos calorias, mais enzimas, mais fatores imunológicos (Imunoglobulinas IgA, IgG, IgM, IgD, IgE, lactoferrina, lisozima, interferon, fatores do complemento, lactoperoxidase) e mais carboidratos (oligossacarídeos, glicopeptídeos, glicose, galactose e a lactose) (KENT *et al.*, 2006). À medida que o leite vai sendo retirado da mama, os componentes vão sendo substituídos e acrescidos de outros (fração suspensão), com maior quantidade de proteínas, cálcio e fósforo. Com a continuidade do esvaziamento mamário, o leite vai sendo acrescido de mais componentes, principalmente a gordura, cuja quantidade oferece, ao final da mamada, mais da metade de toda energia do leite materno (ALMEIDA, 1999a).

Valentine *et al.* (1994) afirmam que a gordura do final da mamada chega a ser três vezes maior que no leite do início. A interrupção da mamada pode fazer com que o RN receba pequena quantidade de leite do final da mamada e não obtenha ganho de peso adequado (KING, 1998).

Quanto à composição química do LH reconhecem-se muitas substâncias, que variam conforme os períodos da lactação, e com as fases da lactação, principalmente no conteúdo total de lipídios, que pode ser variável em amostras de leite de uma mesma nutriz e entre as nutrizes, no decorrer de todo período de amamentação (ALMEIDA, 1999a; BIANCUZZO, 2003; EUCLYDES, 2005; MASTROENI *et al.*, 2006; COSTA; SABARENSE, 2010). Conforme Moura (2010) as substâncias do LH são classificadas em três grupos:

- a) Específicas para espécie, como as imunoglobulinas;
- b) Específicas para o organismo, como a lactose;
- c) Específicas para a espécie e para o organismo, como os lipídios.

Há muito tempo que a literatura científica mostra que as crianças amamentadas contraem menos infecções do que aquelas que recebem leite artificial. Almeida (1999) relata que o LH apresenta fatores de superioridade devido a sua composição química balanceada, melhor digestibilidade e a criança que continua em aleitamento durante uma infecção se recupera mais rapidamente, além de que o LH as protege enquanto o seu sistema imunológico vai amadurecendo, uma vez que a resposta imune não atinge sua capacidade plena antes dos cinco anos de idade (LANG; LAUREWCE; ORME, 1994; NEWMANN, 1995; NOBREGA; CAMPOS, 1996).

2.1.1.1 Os lipídios e as proteínas do leite humano

O teor de gordura constitui-se na principal fonte calórico-energética do LH, constituído de colesterol, ácidos graxos essenciais e vitaminas e outros componentes lipossolúveis (ALMEIDA, 1999b; JENSEN, 1999; KOLETZKO *et al.*, 2001; TINOCO *et al.*, 2007; LAMOUNIER; LEÃO, 2008; BORGIO, 2011). Do seu total de gorduras, o LH apresenta 98% de triacilglicerois, 1% de fosfolipídeos e 0,5% de esteróis, que se apresentam na forma de glóbulos de cerca de 4 micra de diâmetro em emulsão do tipo óleo em água, estabilizada por uma membrana contendo fosfolipídeos e proteínas.

O LH ordenhado contém, em média, 70 Kcal/mL e sua fração lipídica é responsável por 50 a 60% destas calorias. O conteúdo total de lipídios e a sua composição de ácidos graxos, são variáveis e sofrem influência de vários fatores como o tempo de lactação, idade gestacional e dieta materna (JENSEN, 1999; KOLETZKO *et al.*, 2001; LIRA, 2002; ANDERSON *et al.*, 2005; YAMAWAKI *et al.*, 2005).

Para classificação da qualidade do LH quanto ao seu valor calórico, a rBLH-BR utiliza o método do crematócrito (SILVA *et al.*, 2007). Este se constitui em um micrométodo rápido que indica a quantidade de creme, o qual é constituído predominantemente pela gordura do LH, e estima a sua concentração e o valor calórico da amostra. Afirmam Lucas *et al.* (1978), criadores do método, que a gordura é o principal determinante do valor calórico do LH. Wang *et al.* (1999) concluíram que o lipídio é o substrato que fornece a principal fração de energia do LH, e que a variação do seu índice de energia é, na maior parte, devido à variação em sua concentração de gorduras. O método baseia-se nas diferenças de densidades dos constituintes do LH: as frações emulsão, suspensão e solução, que apresentam uma relação de proporcionalidade entre si. Isto explica a relação linear entre o crematócrito e o índice de energia do LH, independente das concentrações do carboidrato e da proteína. Portanto, este método prediz exatamente a concentração do lipídio e do índice de caloria total do LH analisado.

Quando comparado ao leite de vaca, o LH possui maior teor de esteróis, sendo o colesterol a fração mais preponderante (90%). Esta ingestão elevada pelo RN, comparada a do adulto, tem sido sugerida como fator altamente benéfico, pois está envolvido no desenvolvimento do sistema nervoso central, mediante a síntese de mielina, além de ser utilizado na produção de ácidos biliares e hormônios (JENSEN, 1999; EUCLYDES, 2005).

Marin *et al.* (2009) analisaram amostras de leite de mães de RNPT e de mães de RNT e obtiveram como resultado um aumento nos ácidos graxos de até 14 átomos de carbono e dos ácidos graxos poliinsaturados (AGPL) nas amostras de leite das mães de RNPT em relação às amostras de leite de mães de RNT. Concluíram que a idade gestacional influi na composição dos ácidos graxos e que o leite de mães de RNPT é uma fonte imprescindível de elementos energéticos e de elementos plásticos, fundamentais para a síntese de lipídios estruturais e para o desenvolvimento

neural. Interessante é relatar um estudo de Marin¹ (1982, citado por BECKER; FIORI, 1983) que analisou o lactócrito (outro termo que se refere ao valor calórico do LH) do leite de mães subnutridas e eutróficas de cinco estados brasileiros e concluiu que não há diferença estatisticamente significativa nos resultados apresentados pelos dois grupos. Diferentemente, Gibson e Makrides (2001), Jensen e Lapillonne (2009) quando analisaram a composição das gorduras, demonstraram que o teor de ácidos graxos poliinsaturados é fortemente influenciado pela dieta materna.

Já Koletzko *et al.* (2001), relataram que a maior proporção dos AGPL não é oriunda somente da alimentação materna, e que esta não é a sua principal fonte, mas sim a do metabolismo lipídico dos estoques corporais, e da síntese endógena a partir dos precursores com 18 átomos de carbono, o que ocorre no fígado, glândula mamária e outros tecidos. Resultados semelhantes foram desenhados por Spear *et al.* (1992), quando observaram mudanças nos valores destes ácidos no leite de uma mesma mulher durante a amamentação exclusiva de dois filhos em épocas diferentes (o segundo filho um ano após), mantendo a mesma dieta nos dois períodos de lactação.

Os AGPL, em especial o ácido docosahexaenóico, são deficientes no RNPT devido a sua limitada capacidade em sintetizá-los (MAKRIDES *et al.*, 2000). Segundo Nettleton (1993), o LH supre esta necessidade, o que também foi confirmado nos estudos realizados por Clandini *et al.* (1981). Estes autores acima afirmam que a quantidade dos AGPL, que o RN recebe, varia não só com a dieta materna, como também com o estágio da lactação em concordância com Marin *et al.* (2009). Assim, torna-se complexo manufaturar uma fórmula infantil com a composição adequada e semelhante ao LM, pois estes ácidos podem ser sintetizados a partir de precursores do próprio leite, e não se sabe ao certo, quais níveis plasmáticos são necessários para suprir as necessidades dos RNPT que não recebem LH.

Tinoco *et al.* (2007), em artigo de revisão, concluíram que a qualidade dos lipídios ofertados pelo LM nos primeiros meses de vida, podem ser determinantes no crescimento e desenvolvimento infantil, bem como na resposta imunológica da

¹ MARIN, P. **Qualidade do leite humano em mães subnutridas-avaliação em cinco estados do Brasil**. Conferência no I Simpósio Brasileiro de Aleitamento Materno. Porto Alegre, 1982.

criança, inclusive com proteção até a vida adulta. Os autores reforçam que, se os estoques maternos de AGPL forem insuficientes na alimentação, eles serão produzidos a partir dos estoques corporais maternos. Minda *et al.* (2004) demonstraram que a composição dos ácidos graxos essenciais (AGE) como o alfa-linolênico, sofre alteração durante a lactação, com aumento significativo nas duas primeiras semanas pós-parto, mas não para o linoleico, que não variou durante o primeiro mês. Para o eicosahexanênico, eiconsapentaenóico, araquidônico, eicosatrienóico, os autores mostraram aumento durante todo período pesquisado (até 28 dias de pós-parto). Muitos estudos têm demonstrado que o perfil dos AGE do LH é modulado pelo tipo de alimentação materna, e quando o alimento é rico nestas substâncias, reflete diretamente no seu conteúdo no LH (CUNHA; COSTA; ITOI, 2005; PATIN *et al.*, 2006; MARIN *et al.*, 2009). Dijck-Brouwer *et al.* (2005), em sua pesquisa relacionando a quantidade de AGE e o desenvolvimento neurológico em 317 RNT, encontraram menores teores de ácido docosahexaenóico e de outros AGE no sangue do cordão umbilical dos RNT classificados como neurologicamente anormais.

Uma característica importante é a presença da enzima lipase no LH, estimulada por sais biliares, que torna-se bastante ativa no intestino dos lactentes amamentados, e apresenta atividade contra agentes infecciosos, como a giárdia e os vírus encapsulados. O LH pasteurizado perde estes efeitos pois a lipase é total ou parcialmente destruída pelo calor (JENSEN, 1999; BORGO, 2011).

Quanto às proteínas, segundo Ricco, Del Ciampo e Almeida (2000) o LH oferece praticamente todos os aminoácidos necessários e em quantidades adequadas para o RN, de alto valor biológico, essenciais para os RNPT, que apresentam deficiência bioquímica e funcional.

As micelas de caseína, que se encontram em estado de suspensão coloidal, são o principal componente da fração suspensão do LH, junto com quase todo cálcio e fósforo. Sua função é de fato nutricional e construtora, assim destinada a suprir as necessidades do lactente. O cálcio está aprisionado dentro das micelas de caseína e é disponibilizado à medida que ocorre a digestão (ALMEIDA, 1999a). As outras frações de proteínas encontram-se em estado de solução e são constituídas por hormônios, proteínas do soro, enzimas, fatores de crescimento e de proteção (HECK, 2002).

A concentração de proteínas do LH decresce rapidamente no primeiro mês de lactação e segue mais lentamente, acompanhando a velocidade de crescimento da criança (EUCLYDES, 2005). Segundo Akre (1997), o LH dos primeiros dias contém

cerca de 25 gramas de proteínas por litro. Quando a lactação se estabelece, o equivalente em Nitrogênio, reduz para 12 a 8 gramas por litro, em média, sendo 25% nitrogênio não proteico, ureia e nucleotídeos. Para Vinagre (2002), o conteúdo médio de proteínas no LH no primeiro mês após o parto a termo é de 13 gramas por litro, com variações de 11,3 a 20,7 gramas. Quando o conteúdo de proteína é determinado com base nos aminoácidos, o valor é de 8 gramas por litro. Para Benkol e Le Leiko (1987) este teor proteico do LH é ideal, e de excelente qualidade considerando a imaturidade do organismo do RN.

Com relação às proteínas do soro do LH, há a predominância da alfa-lactoalbumina, não alergênia, que chega a 80% do total, apresenta baixo peso molecular e junto à baixa concentração de caseína, formam um coalho mais leve, o que confere a alta digestibilidade do LH com menor tempo de esvaziamento gástrico (LAMOUNIER; LEÃO, 2008). No leite de vaca predomina a Beta-lactoglobulina, considerada alergênica ao RN, de alto peso molecular e de difícil digestão. Além disto, o LH não possui na sua composição uma fração da caseína, a alfa S-1 altamente alergênica, presente no leite de vaca.

Em relação aos aminoácidos, o LH contém o maior teor de triptofano dentre todas as fontes alimentares. É rico em lisina, leucina, tirosina e cistina, além das imunoglobulinas já citadas, e dos fatores de crescimento que promovem o amadurecimento do tubo gastrointestinal, específicos para a espécie. O percentual das proteínas do soro também é modificado ao longo da lactação, sendo que no colostro representam cerca de 80%, e nas fases seguintes da lactação, diminuem para 50 % (ALMEIDA, 1999a; LONNERDAL, 2003; SILVA *et al.*, 2007; HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006).

2.2 O RECÉM-NASCIDO PREMATURO - RNPT

A cada ano nascem cerca de 15 milhões de bebês prematuros no mundo, o que significa que, mais de um em cada 10 partos são prematuros, de acordo com um informe divulgado pela Organização Mundial da Saúde no dia 02 de maio de 2012. (WHO, 2012). Os resultados do relatório, que contou com mais de 100 especialistas, mostraram que mais de um milhão destes bebês morrem pouco depois de nascidos,

por causas que poderiam ser evitadas com cuidados básicos, intervenções simples e de baixo custo, como o incentivo do contato pele a pele entre a mãe e o RN, hábito que mantém o aquecimento e facilita a amamentação.

Segundo estudo realizado por profissionais da Universidade Federal de Pelotas (UFPL) em 2013, financiado pelo Ministério da Saúde e pelo Fundo das Nações Unidas para Infância (UNICEF), o Brasil, através do Sistema de Informação sobre Nascidos Vivos (SINASC) subestimou o número de prematuros em 40% ao longo da década passada. Aplicando um fator de correção, os pesquisadores chegaram à conclusão que a taxa de bebês nascidos prematuros foi de 11,7% em 2010, e não de 7,2%, como registrado no SINASC. Para o UNICEF, o patamar é elevado e esse percentual coloca o Brasil no mesmo patamar de países de baixa renda, onde a prevalência é de 11,8%.

Segundo Victora (2013), nos países de renda média, o percentual de RNPT é de 9,4% e o Brasil se encontra entre os 10 países com o maior número de nascimentos prematuros, que em 2010 superou a cifra de 280 mil nascimentos. A prematuridade é a principal causa de mortalidade de crianças de até sete dias de vida (28%) no Brasil, além de aumentar os riscos de deficiências ao longo da vida. O estudo supracitado distinguiu a prematuridade como um dos mais importantes problemas de saúde pública no Brasil e sua redução é uma das metas centrais dos objetivos do milênio e um dos grandes desafios (UNICEF; BRASIL, 2014).

Segundo Fletcher (1999); Kenner (2001) e Zelcowitz (2012), RNPT é a criança de parto ocorrido antes de completar 37 semanas ou 260 dias de gestação. O RNPT também pode ser classificado de acordo com seu peso de nascimento, em RNPT de baixo peso (inferior a 2.500 gramas); os de muito baixo peso (RNMBP), (inferior a 1.500 gramas) e os RN de extremo baixo peso (RNEBP) (inferior a 1000 gramas), (DINIZ; COSTA, 2003).

A população de RNPT é a que apresenta maior risco de mortalidade e morbidade. Suas limitações estão ligadas à imaturidade dos órgãos e sistemas, à instabilidade de suas funções vitais básicas e à imaturidade do reflexo de sucção e deglutição (NEIVA; LEONE, 2007; SANTANA *et al.*, 2010; SAIGAL, 2012). Os RNPT apresentam necessidades nutricionais especiais e capacidade funcional diferente dos que nascem a termo, como maior suscetibilidade para desenvolver deficiências nutricionais, capazes de afetar o seu crescimento e desenvolvimento pós-natal (FIGUEIRA, 2004). Além disto, apresentam pouca reserva de carboidratos e gordura,

maior necessidade de glicose para energia e metabolismo cerebral, e maior perda de água insensível. Mesmo naqueles RNPT em que a alimentação não está contra indicada, pode haver dificuldade quanto a sua tolerância, já que esta população possui um trato gastrointestinal imaturo, caracterizado por peristalse mais lenta (GIANINI, 2001). E logo após o nascimento, muitos precisam permanecer em jejum, devido a instabilidade clínica importante, o que é pouco tolerado devido a seu estoque reduzido de nutrientes (FEFERBAUM *et al.*, 2003). A recomendação atual é que, se houver necessidade de jejum, que ele ocorra pelo menor tempo possível e, após este período, o alimento ideal a ser introduzido é o leite da própria mãe, ordenhado e repassado ao RNPT (QUINTAL; DINIZ, 2005; APRILE, 2006; BRASIL, 2011).

A Academia Americana de Pediatria (AAP, 2012) em sua declaração sobre a política de AM para as crianças de alto risco, refere que os hospitais e médicos devem recomendar amamentação direta ou utilizar o leite da própria mãe ordenhado para prematuros e outras crianças de alto risco.

No Manual do Ministério da Saúde, Brasil (2011) é enfatizado que o AM é o modo mais natural e seguro para nutrição das crianças até os 6 meses de vida. Quanto à frequência e a duração do AM dos RNT comparados aos RNPT, foi constatado que ambas são menores nos RNPT. Entre as causas apontadas, estão a dificuldade no estabelecimento e na manutenção de uma produção eficiente de leite por parte da mãe do RNPT, ocasionada pelo estresse a que ela é submetida, o afastamento de seu bebê devido às doenças neonatais, frequentemente associadas à prematuridade e à maneira como é realizada a transição alimentar (CALLEN; PINELLI, 2005). Segundo Nascimento e Issler (2004), em um artigo de revisão sobre AM, os melhores resultados no aleitamento dos RNPT são obtidos quando o mesmo é apoiado pela equipe de profissionais das Unidades de Neonatologia, com atenção dedicada à mãe e quando o estímulo acontece desde as primeiras horas após o nascimento da criança. Estes autores concluíram que as mães prematuras necessitam de mais informações sobre a importância da amamentação, para que possam tomar decisões sobre a nutrição dos seus filhos.

Acompanhando a hospitalização do recém-nascido, muitas mães percebem que amamentar é uma das únicas maneiras de contribuir para a recuperação de neném. No entanto, poucas dessas mães conseguem começar e continuar a produção adequada de leite sem a ajuda de um profissional de saúde e sem o apoio da família.[...] A equipe de apoio depende de especialistas de outras áreas, incluindo psicologia, terapia ocupacional, terapia corporal, e

fonoaudiologia. Por exemplo, conselhos individuais e outras questões; isto estimula a confiança materna na sua capacidade de cuidar do prematuro, particularmente em relação à amamentação (NASCIMENTO, ISSLER. 2005, p.47 e 49, tradução nossa).

Giugliani (2000) cita que a amamentação é a forma ideal de alimentar as crianças pequenas e precisa ser facilitada pelos profissionais de saúde, através de uma prática clínica adequada.

2.2.1 Características morfofuncionais do RNPT e o leite humano

Embora muitas estratégias de atenção à saúde tenham sido desenvolvidas para superar as limitações da prematuridade, o crescimento e suporte nutricional a essas crianças ainda permite discussão e pesquisas. Alcançar um adequado crescimento e suporte nutricional em RNPT e de baixo peso é, frequentemente, difícil durante a hospitalização, não só pela imaturidade metabólica e gastrointestinal, como também pela função imunológica comprometida e por outras condições médicas complicadoras.

A referência para um ótimo crescimento pós-natal, para RNPT tem sido historicamente a taxa intra uterina de aumento no peso, comprimento e perímetro cefálico observados em fetos de mesma idade gestacional (MORLEY; LUCAS, 2000; ANCHIETA; XAVIER; COLOSIMO, 2004). Contudo, sabe-se que estes parâmetros podem não ser alcançados no ambiente extraútero, por causa das limitadas tolerâncias metabólicas e digestivas, além do quadro clínico frequentemente complexo e grave, que transforma a nutrição em um desafio. Assim, para Vinagre e Diniz (2002) as análises das curvas de crescimento pré e pós-natais estão sujeitas a críticas, pois os suportes nutricionais para o feto não são os mesmos da vida extra-uterina, e esta avaliação não considera a perda fisiológica que ocorre depois do nascimento, nem o fato das crianças nascerem em idades gestacionais diferentes, e de o crescimento fetal sofrer influências das condições maternas individuais.

O início precoce da alimentação com LH previne efeitos iatrogênicos decorrentes da dieta parenteral prolongada. Sabe-se ainda que o leite da própria mãe, sendo fornecido precocemente, modifica a motilidade intestinal, com o aparecimento de

padrões mais ordenados, maior presença de atividade motora migratória e menor duração do trânsito intestinal (MENA, 2005). Muitos dos RNPT com 32 ou mais semanas podem e devem ser amamentados por suas mães e, mesmo as crianças de menor idade gestacional, que poderão necessitar de outras formas de nutrição, como a parenteral, também podem receber o LH (AKRÉ, 1997; NYQVIST, 2013). Schanler (2001) também sugere que os RNPT, com 1.500 gramas ou mais, desenvolvem-se bem com LME e que a sua indicação para estas crianças não explicita limites de peso. Almeida (1999a), Vinagre (2001) e Ramos (2008) citam que o leite de mães de prematuros apresenta uma composição que vai se adaptando às necessidades fisiológicas, nutricionais e imunológicas destes recém-nascidos, não sendo apenas fonte de nutrientes, mas é capaz de exercer certo controle sobre o metabolismo destes RN.

Com relação à anatomia do sistema digestório, embora já formado, há uma imaturidade das funções fisiológicas, de modo que a digestão e absorção ficam prejudicadas no RNPT. Ocorre maior permeabilidade dos nutrientes parcialmente digeridos, especialmente os peptídeos e, que aliada à imunodepressão, característica desta faixa etária, predispõe à translocação bacteriana, possibilitando a colonização e o risco de *seps*e endógena (RUGOLO, 2005). Segundo Ramos (2008), ainda quanto ao amadurecimento do sistema digestório do RNPT, as enzimas digestivas começam a aparecer por volta da 12.^a semana de vida fetal, quando se inicia a diferenciação celular das vilosidades intestinais, que serão importantes na digestão do leite após o nascimento, como a lactase e outras enzimas dos carboidratos. Os RNMBP, mesmo apresentando baixa concentração de lipase pancreática e sais biliares, podem receber o LME, pois este estimulará a maturação do sistema digestório e proverá a lipase e outras enzimas digestivas. Segundo Vinagre e Diniz (2002) a deglutição *in útero* ocorre a partir da 16.^a semana de idade gestacional e embora elementos da motilidade intestinal sejam detectáveis ao final do 2.^o trimestre, a atividade esofágica organizada só se desenvolve a partir da 34.^a semana, quando o feto já pode manter a sucção nutricional efetiva. A capacidade gástrica do RNPT é limitada e a distensão do estômago pode interferir na função pulmonar (GONÇALVES *et al.*, 2005).

Após receber o LM, o esvaziamento gástrico para o RN é mais rápido do que quando recebe leite de fórmulas, devido às diferenças nas características da caseína presente neste último que, em pH ácido forma um grande "coágulo" (semelhante a

um queijo) e dificulta a ação das enzimas digestivas (ALMEIDA,1999a; LAMOUNIER; LEÃO, 2008). Assim, o RN gasta mais tempo para digeri-la. Já o LH, em meio ácido, forma "flocos" pequenos de proteínas, tornando-o mais digestivo (VALDÉS *et al*, 1996; SGARBIERI, 2005). A nutrição ótima para muitos RNPT só é alcançada através da combinação das técnicas enteral e parenteral, em que alguma quantidade de alimento no tubo digestivo é benéfico para estimular a resposta endócrina mais fisiológica, fluxo da bile e maturação da mucosa intestinal. Para Almeida (1999a), o leite da própria mãe cru, tem vantagens em comparação a outros tipos de leite devido a sua composição homóloga, compatível com a idade gestacional, pelo amplo espectro de hormônios e fatores de crescimento espécie-específico presentes.

Ramos (2008) descreveu que o LH de mãe de RNPT apresenta propriedades especiais diferentes quando comparado ao LH de mãe de RNT, como a concentração de nitrogênio e o valor calórico maiores no primeiro, durante as semanas iniciais de lactação, além de concentrações mais elevadas de alguns sais minerais como o cálcio, fósforo, magnésio, zinco, sódio. O Comitê de Nutrição da Sociedade de Pediatria do Canadá, fundamentado em vários estudos sobre necessidade de nutrientes e alimentação de RNPT, indica que estes nutrientes estão em concentrações não suficientes para atender às necessidades do RNMBP, e recomenda que a prioridade é o uso do LM aditivado (CANADIAN PEDIATRIC SOCIETY, 1995).

Estudos clínicos realizados por Schanler, Hurst e Lau (1999), Schanler (2001) e O'Connor *et al.* (2008) sobre efeitos do uso do LH acrescido de aditivos em RNPT, mostraram que o ganho de peso é mais rápido em relação aos que recebem fórmulas de leite artificial (LA). Pelas suas propriedades inigualáveis, o LM é o alimento recomendado; o LH de BLH ou o da própria mãe, preferentemente, também servem como base para os casos de necessidade de aditivos.

Ainda segundo estes autores, o LH reduz a incidência de enterocolite necrosante (ECN) nos pré-termos. Schanler *et al.*(1999)mostrou que o LME acrescido de aditivos apresenta menor risco de ECN do que o LA. Com base nestas evidências, os autores apontados incentivam o uso do LME, além do contato pele a pele, que também oferece a proteção espécie-específica. Segundo Lucas e Cole (1990) e Simpson, Schanler e Lau (2002), os RNPT que recebem LH apresentam ainda menores níveis de bilirrubinas, menos episódio de hipoglicemias sintomáticas, menor incidência de pneumonia por aspiração, menor incidência de ECN, menor risco de desenvolverem diabetes tipo I (VISALLI *et al.*, 2003).

A incidência de qualquer infecção, como sepsis e meningite, é significativamente menor nos RNBMP alimentados com LH quando comparados aqueles que recebem exclusivamente LA (SILFVERDAL *et al.*, 2002)

Estudos internacionais, citados por Ramos (2008) comparando os efeitos a curto prazo (dias ou semanas), médio (meses) e longo prazo (de 1,8 até 8 anos) sobre os RNPT que receberam LA especial, leite humano ordenhado pasteurizado (LHOP) de BLH, e leite da própria mãe, concluíram que o ganho de peso é mais rápido nos RNPT com uso de LA nos primeiros dias ou semanas e em até alguns meses. Já na área de adaptação, linguagem, e quociente de inteligência não houve diferenças em médio prazo. Quanto ao desenvolvimento neuropsicomotor, constataram que os resultados foram superiores na maioria das crianças que receberam o LH, ao mesmo tempo que a mineralização óssea destas, também foi mais adequada do que naquelas com LA, aos 4 e 5 anos e também aos 7 e 8 anos.

Também houve diferença significativa nestes estudos, quando foi comparada a incidência de ECN entre os RN que usaram fórmulas de LA para RNPT, com aqueles que receberam LH procedente de BLH. Os resultados revelaram que com o uso de fórmula LA exclusiva houve 7,2% de ECN; com o uso concomitante de fórmula LA e leite ordenhado materno, 2,5% de ECN; com leite exclusivo de BLH e também com uso de leite de BLH mais leite materno, 1,2% de ECN (MORLEY; LUCAS, 1994).

Estes resultados vem de encontro com a conclusão da revisão técnica, a qual indica a alimentação dos RNPT com menos de 32 semanas de gestação com LH, pois estes apresentam redução na incidência de ECN quando comparado aos RN que receberam fórmula LA (EDMOND; BAHL, 2006). Esta constatação refere-se tanto ao LH doado de BLH como ao LH da própria mãe. Bisquera, Cooper e Berseth (2002) citam que a barreira da mucosa gastrointestinal é imatura no RNPT, um sistema aberto que permite absorção de moléculas grandes e, mesmo favorecendo a transferência dos fatores de proteção(imunidade passiva do LH), como a alfa-lactoalbumina, apontada como fator anticancerígeno(apoptose celular), também permite passagem das bactérias, partículas virais e toxinas pela mucosa (SVENSSON *et al.*, 2000). Esta permeabilidade é mais pronunciada nos RN com menos de 35 semanas de IG. Estes autores concluíram que a permeabilidade diminui mais lentamente nos RN alimentados com fórmula LA.

O maior desafio em nutrição de RNPT está em atender às necessidades dos RNEBP, pois o longo período de internação a que estão sujeitos é de muitos riscos e intercorrências (CAMELO; MARTINEZ, 2005). Suas mães podem ter mais dificuldades para produção láctea, o que também exigirá da equipe de profissionais um comprometimento maior no apoio e acompanhamento do aleitamento, na estimulação da lactação e supervisão do manejo com leite ordenhado (NASCIMENTO, ISSLER, 2004).

No início da vida nas Unidades de Neonatologia, o RNPT, dependendo de seu estado de saúde e idade gestacional, pode necessitar de suporte alimentar parenteral (KOPELMAN *et al.*, 2004; AQUINO; OSORIO, 2008) e não receber leite de sua mãe por motivos que indiquem a necessidade de jejum. Quando o RNPT for liberado para nutrição enteral, poderá receber o leite materno ordenhado por via sonda orogástrica ou nasogástrica. A nutrição trófica ou enteral mínima, que é iniciada com pequenos volumes (1ml/kg geralmente), embora possua pouco valor nutricional, contribui para o desenvolvimento do sistema digestório ainda imaturo, e como o volume da alimentação é aumentado gradativamente, proporciona um tempo adequado para a sua adaptação (McCLURE; NEWELL, 1996; PAPAGEORGIOU; BARDIN, 1999; KOPELMAN *et al.*, 2004; MATTAR; QUINTAL, 2008).

Na nutrição trófica (enteral mínima), o ideal é utilizar o leite fresco ou leite anterior da própria mãe. Na falta deste, utilizar leite humano processado (LHP) de idade compatível, de baixo teor calórico (<500Kcal/L), considerado como leite anterior, rico em fatores de proteção, aumenta hormônios intestinais, possui fatores de crescimento epitelial, substâncias antioxidantes e quinonas. Na nutrição enteral plena, dependendo das necessidades e das intercorrências clínicas do recém-nascido, o ideal é utilizar o leite da própria mãe do recém-nascido pré-termo, fresco ou LMP >700Kcal/L (leite posterior), ou na falta deste, o leite humano pasteurizado, homólogo para idade gestacional, hipercalórico (>700Kcal/L) (MATTAR; QUINTAL, 2008, p.552).

Atualmente está sendo utilizada a colostroterapia (higiene oral, lavagem gástrica e a administração de gotas colostrais) para os RNMBP, aos quais o colostro representa um suplemento imunológico, embora ainda necessita de mais evidências científicas para que seu uso seja generalizado. A colostroterapia é recomendada mesmo no jejum, ainda nas primeiras 24 horas de vida destas crianças, dependendo da IG. O ideal para o adequado uso desta técnica a recomendação é que seja praticado o método Canguru precocemente (VENÂNCIO; ALMEIDA, 2004; MARINETTI; HAMELIN, 2005; GUILHERME; MATTAR; BATISTA, 2010).

Atingindo a maturidade para o ato de deglutir, cuja coordenação sucção-deglutição ocorre entre a 32.^a e 34.^a semanas de idade gestacional (NYQVIST, 2013). o RNPT poderá receber o leite materno via oral, sendo indicado um período de transição da dieta por sonda orogástrica ou nasogástrica para a via oral, utilizando-se o copo ou a xícara (SCOCHI *et al.*, 2010). Muitos RNPT de baixo peso que apresentam condições para sucção, deglutição e respiração coordenadas, não são liberados para amamentação, pois isto demanda gasto energético, o que precipita perda ponderal (SAMIR; ALMEIDA, 2005). Nesta situação, utiliza-se o método do copo, que é seguro para alimentar o RNPT, e o mesmo tem sido descrito por alguns autores (LANG; LAUREWCE; ORME, 1994; KING, 1998; AQUINO; OSORIO, 2008; LIMA; MELO, 2008; SCOCHI *et al.*, 2010) além de ser recomendado conforme Manual do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011).

Segundo Marinelli, Burke e Dodd (2001), o copo pode ser considerado como método artificial de proporcionar uma alimentação segura ao prematuro até que ele esteja forte e maduro o suficiente para sugar. O objetivo do método do copinho, como é conhecido, é evitar o contato do bebê com outros bicos que não o da mama, evitando a confusão no ato de sugar quando o RNPT tiver condições de mamar diretamente na mama de sua mãe (SILVA *et al.*, 2009). O fornecimento de LM através de utensílios, como o copo ou colher, e mesmo seringa, tem favorecido a manutenção do aleitamento materno após a alta hospitalar (VINAGRE; DINIZ, 2002). Aquino e Osório (2008) numa revisão de literatura sobre métodos para alimentar RNPT mostraram que aqueles alimentados por copinho, apresentaram melhores resultados em relação à estabilidade fisiológica e ao impacto na amamentação exclusiva na alta hospitalar, quando comparados aos RNPT que receberam alimentação por mamadeira.

O apoio materno deve ser fornecido o mais precocemente possível, pois a mãe do RNPT é uma “mãe prematura” e se encontra numa situação especial. A aditivação do LHO pode ser indicada para os RNMBP, quando as mães estão com dificuldades de manejo da lactação ou mesmo de produzir LM suficiente nos primeiros dias pós-parto (DELGADO; HALPERN, 2004; REGO, 2009). Também pode ser oferecido LHOP ajustado, de BLH, como sugerem Aprile *et al.* (2010), ao terem observado crescimento satisfatório em RNMBP que receberam LHOP de BLH com VC superior a 70Kcal/100mL e >2gramas de proteína. Os autores concluíram que

escolher um LHOP de BLH adequado às necessidades destes RN, promove boa evolução clínica e pode ser uma alternativa de alimentação adequada,

Para as crianças RNMBP tem sido recomendada uma nutrição com proteína e caloria mais elevada, em solução parenteral, a qual deve ser iniciada precocemente, e seguida de nutrição enteral mínima nos primeiros dias, com colostro. O LM pode ser aditivado ou não, pois a ideia é preservar o uso do leite da mãe e acrescentar o que lhe falta para suprir as necessidades do RNMBP (RAMOS, 2008). Já Ruiz, Charpak e Figueró (2002) questionam a decisão de muitos neonatologistas, de que todos RNPT que estão em AME, devam receber aditivos nutricionais e propõem uma avaliação individualizada para identificar quais realmente necessitam, até porque a oferta de LH com aditivos não é isenta de riscos (McCLURE; NEWELL, 1996).

Arslanoglu; Moro e Ziegler (2010) propõem a “aditivação alvo”, que consiste em analisar o LH quanto ao seu valor proteico e acrescentar o aditivo considerando o valor proteico encontrado. Propõem também a “aditivação ajustada”, na qual a ingestão proteica é ajustada de acordo com a resposta metabólica do RN.

Essencial é que o leite da mãe seja a base nutricional para estas crianças, aditivado ou alternado com LHOP de BLH para que recebam todos seus benefícios.

2.3 POLÍTICA DE ALEITAMENTO MATERNO NO BRASIL E A CRIAÇÃO DA REDE BRASILEIRA DE BANCO DE LEITE HUMANO (RBLH-BR)

No ano de 1943, nasceu no Instituto Nacional da Mulher, da criança e do adolescente Fernandes Figueira (IFF/Fiocruz), o primeiro BLH e teve início uma trajetória brasileira vitoriosa, que culminou a partir de 2000, em uma ação que tornou o país referência mundial em tecnologia para a redução da mortalidade infantil e da desnutrição neonatal. São hoje mais de duas centenas de BLH instalados em todos os estados da Federação, e outros em pleno funcionamento em várias nações da América Latina, Caribe, Península Ibérica e África, que seguiram o modelo brasileiro (MATTAR; QUINTAL, 2008; MENCONI, 2010).

O Banco de leite humano surgiu como uma estratégia de qualificação da assistência neonatal em termos de segurança alimentar e nutricional, como foco em ações que ajudam a reduzir a morbimortalidade infantil em instituições hospitalares. O trabalho é voltado para um seguimento muito específico: crianças que demandam cuidados especiais em unidades de terapia semi-intensiva e intensiva, ou seja, bebês que nasceram prematuros, com baixo peso, crianças que pelas mais variadas razões precisam de uma atenção especializada. Além disso, a iniciativa também inclui uma forte política de apoio à amamentação: toda e qualquer mulher que tenha problemas ou dificuldades para amamentar pode procurar apoio nos bancos de leite humano (ALMEIDA, 2013, p.14).

O Brasil iniciou a luta para reduzir os altos índices de mortalidade infantil no país, com a criação do Programa Nacional de Alimentação e Nutrição, em 1976. Este teve como objetivo a elaboração de estratégias para o combate à desnutrição infantil, na época em que já havia a preocupação com os problemas decorrentes do desmame precoce. Foi em 1979, após a reunião conjunta da OMS-UNICEF, sobre alimentação de lactentes e de crianças pequenas, que o Brasil alavancou no incentivo ao aleitamento materno, utilizando as estratégias primeiramente sugeridas e elaboradas em conjunto com a OMS/UNICEF e Organização Pan Americana da Saúde (OPAS). Em 1981, foi criado o Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento materno (PNIAM) e, a partir de então, surgiram vários Comitês voltados à saúde da mulher, da gestante, da criança e, entre eles, surgiu o Comitê Nacional de BLH, que tinha como meta aperfeiçoar as condições operacionais dos BLH no Brasil, tornando-os centros de promoção ao aleitamento materno, especialmente nas condições de risco, a exemplo da amamentação aos RNPT, relactação e lactação adotiva (ALMEIDA, 1998).

O PNIAM alcançou muitos resultados até o final da década de 80, com reconhecimento internacional pela diversidade de ações. Dentre elas, a publicação de várias Portarias pró aleitamento materno, como a Portaria do Gabinete do Ministro, número 18, de 1983, estabelecendo a criação do sistema de Alojamento Conjunto, e a Portaria 322, de 1988, do Ministério da Saúde que regulamentou o funcionamento dos BLH. Outras ações que se destacaram: a capacitação de profissionais em aleitamento materno; o uso da mídia com a realização de campanhas utilizando artistas famosas; a produção de material educativo; a conquista da licença maternidade de 120 dias; a aprovação da Norma Brasileira para Comercialização de Alimentos para Lactentes (NBCAL) com a Resolução número 05 do Conselho Nacional de Saúde; e a franca expansão qualiquantitativa dos BLH pelo País.

Segue-se a década de 1990, tendo como destaque a mobilização nacional de apoio ao aleitamento e multiplicam-se os BLH em quase todos estados brasileiros. De apenas cinco unidades no início da década de 1980, para mais de 150 até o final dos anos 90, os quais constituíram a rBLH-BR, criada oficialmente em 1998. Esta contava com os BLH referência estaduais, que tinham como Centro de Referência Nacional, a unidade instalada no IFF/FIOCRUZ, a qual até hoje tem como um dos objetivos, desenvolver metodologias de controle de qualidade do leite ordenhado e estocado, adaptadas às necessidades e à realidade de nosso país, primando pela segurança (GIUGLIANI, 2002a).

O Brasil adotou, ainda na década de 1990, o programa global, que criou a Iniciativa Hospital Amigo da Criança (IHAC) da OMS/UNICEF. Este programa foi transformado na mais importante ação do PNIA, e teve como centro de referência nacional, o Centro de Lactação de Santos, o qual realizou capacitação para equipes multidisciplinares de saúde em aleitamento materno de todo Brasil. Esta equipes trabalharam como multiplicadores do programa em seus estados de origem, e aplicaram o programa da IHAC nos hospitais. Alguns profissionais do Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) fizeram parte deste programa.

A partir de 1992, o Brasil adotou oficialmente a Semana Mundial de Amamentação (SMAM) com a participação de diversos segmentos da sociedade. Nesta década, também apoiou o Método Canguru, que preconiza o atendimento humanizado ao recém-nascido de baixo peso, estimulando a presença da família, a promoção do vínculo, o maior apego mãe e filho, o que influencia positivamente nos índices de aleitamento materno nesta população (VENÂNCIO; ALMEIDA, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2010; BRASIL, 2011). Os BLH tiveram um papel fundamental e relevante para que a realização destas estratégias atingissem seus objetivos (GIUGLIANI, 2002b). A maioria dos hospitais que tinha BLH na década de 1990, conquistou o título de Hospital Amigo da Criança, por ter cumprido todos os passos propostos para o sucesso da amamentação. O HC-UFPR mantém este título desde 1995.

No Brasil, os BLH são considerados estabelecimentos de saúde organizados em rede com programas e metas específicas. A rBLH-BR é, portanto, uma iniciativa do Ministério da Saúde e da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), e tem a missão de promover a saúde da mulher e da criança, mediante a integração e a construção de parcerias com órgãos federais, estaduais, municípios e iniciativa privada (BRASIL,

2008), além de garantir a qualidade microbiológica, nutricional e imunológica do LH doado (RAMOS, 2004; ANVISA, 2008).

A rBLH-BR está presente em praticamente todos os programas de incentivo e promoção ao aleitamento, através de suas unidades espalhadas pelo Brasil. Atualmente o foco principal está na consolidação da rBLH-BR como elemento estratégico para a redução da mortalidade neonatal no Brasil (ALMEIDA *et al.*, 2008), e na estratégia do Programa Nacional de Atenção Integral à saúde da Criança (PNAISC), aprovado em Novembro de 2014, cujo objetivo é promover e proteger a saúde das criança de zero a dez anos de idade, através do eixo AM e alimentação complementar.

O Brasil possui a maior, a mais complexa e a melhor estrutura de rBLH-BR do mundo (GIUGLIANI, 2002b), e seu trabalho evita que mais de 160 mil litros de leite/ano sejam desprezados pelas doadoras com excesso de produção. Trabalho este reconhecido pela OMS, por meio do Prêmio SASAKAWA em 2001, por ter sido apontada como a melhor estratégia brasileira para a diminuição dos índices de mortalidade infantil no Brasil e pela excelência na qualidade do serviço (MENCONI, 2010)

As metodologias alternativas desenvolvidas pelo Centro de Referência nacional, aliam o baixo custo operacional a um nível de rigor técnico-científico, capaz de assegurar um excelente padrão de qualidade, voltadas ao processamento e o controle de qualidade do LH, tipicamente adaptadas às necessidades nacionais, seguras e sensíveis o suficiente para serem praticadas na rotina (BRASIL, 2008). Todas as unidades de BLH no Brasil seguem as Normas Técnicas para funcionamento, prevenção e controle de riscos em BLH, resultado de um trabalho em conjunto com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, a Fundação Oswaldo Cruz e o Ministério da Saúde (ALENCAR, 2008).

A rBLH-BR apresenta modelo operacional (Figura 1) no qual cada BLH é considerado uma unidade geradora de informação, fazendo com que todos participem ativamente da sua construção e tem como objetivos a promoção, proteção e apoio ao AM, a coleta e distribuição do leite humano com qualidade certificada. Com isto busca somar esforços ao Pacto Nacional pela redução da mortalidade materna, neonatal e infantil, implementar os sistemas de garantia de qualidade da rede e ampliar os sistemas de informação e vigilância em BLH (ALMEIDA *et al.*, 2008; PORTAL DA REDEBLH, 2013).

A estrutura organizacional da rBLH-BR segue a Portaria Ministerial n.º 2.193 de 14 de dezembro de 2002.

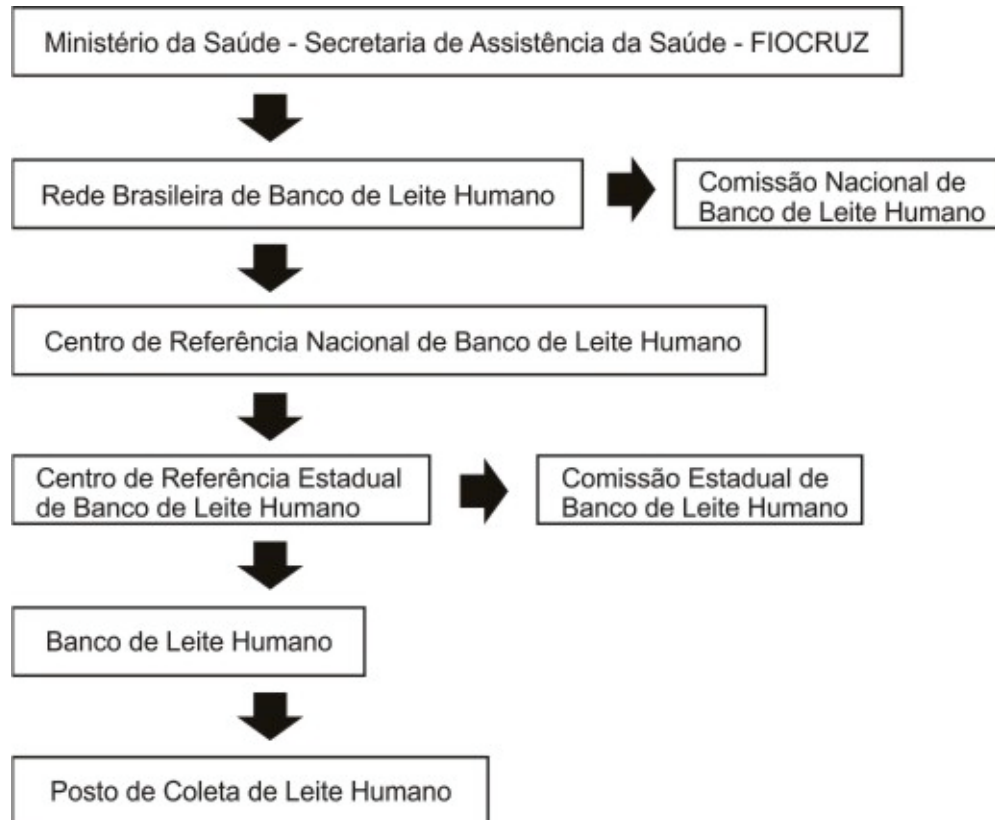


FIGURA 1 - MODELO OPERACIONAL DA rBLH-BR
FONTE: Menconi (2010)

A Secretaria de Atenção à Saúde (SAS), da área Técnica da Saúde da Criança e Aleitamento Materno, é responsável pela coordenação da política pública de saúde referente a BLH, e pela elaboração de critérios para implantação e implementação dessas unidades. Para tanto, conta com a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), a Comissão Nacional de BLH (CNBLH), e o Centro de Referência Nacional de BLH (CRNBLH) para consultoria e assessoria. As Comissões Estaduais de BLH (CEBLH), designadas pelas Secretarias Estaduais, prestam assessorias nos estados, sobre planejamento, controle e avaliação das ações dos BLH.

Os Centros de Referência Estaduais (CREBLH), órgãos de pesquisa operacionais, executam as ações planejadas pelas secretarias Estaduais.

O BLH é um centro especializado, obrigatoriamente vinculado a um hospital com atendimento materno e/ou infantil, e tem como funções executar as atividades de coleta, seleção, classificação, controle clínico, processamento e controle de qualidade do leite humano ordenhado (LHO) e a sua distribuição, sob prescrição médica ou de nutricionista, observando os dispositivos legais vigentes (ALMEIDA, 1999a; BORG, 2005; MATTAR;QUINTAL, 2008; PORTAL REDEBLH, 2013).

O BLH responde pelo funcionamento dos Postos de Coleta (PCBLH) a ele vinculados, estes que podem ser fixos ou móveis, são destinados apenas à coleta do leite excedente das doadoras, pré-estocagem e encaminhamento ao BLH. Também realizam atividades de promoção, incentivo e apoio ao AM (ALMEIDA; NOVAK, 2001; BRASIL, 2008; MENCONI, 2010; PORTAL DA REDEBLH, 2013).

Salienta-se que o Brasil coordena a Rede Iberoamericana de Bancos de Leite Humano (IBERBLH), através do Centro de Referência Nacional e Ibero-americana para BLH, do IFF/FIOCRU. Este centro já divulgou o conhecimento produzido sobre todas etapas do processamento com LHO para os países integrantes, continua capacitando profissionais em BLH, e é considerado modelo também para outros países na Europa e África, que já adotaram a tecnologia brasileira.

2.3.1 O Banco de Leite Humano

Os BLH foram criados com base na comprovação científica a respeito dos benefícios do LM para todas as crianças, e especialmente para os prematuros.

Vinagre e Diniz (2002) citam que os BLH são necessários para auxiliar na nutrição das crianças internadas, pois há mães com dificuldades em fornecer o seu leite fresco ao filho RNPT, especialmente os de baixo peso, internados por longo período, e algumas não têm conhecimento técnico, mesmo querendo oferecer seu leite. O BLH fornece ajuda prática para que as mães consigam manter sua lactação, e suprem a falta do LH das mães de RNPT com o leite das doadoras.

Almeida (1985; 1999a) e Borgo *et al.* (2005) relatam que o objetivo do BLH não é substituir o AM, mas sim incentivá-lo, e tornar possível a otimização do excedente da produção láctea da doadora para atender aos lactentes que não dispõem de leite materno. Representam uma solução de eficácia comprovada para nutrição dos lactentes que não dispõem do leite materno, como na prematuridade, distúrbios nutricionais e alergia à proteína heteróloga, e outras situações conforme critério médico.

O BLH, segundo os seus idealizadores, foi desenhado com o propósito de funcionar como uma instituição de proteção social, incumbida de zelar pelos interesses da doadora e de seu filho, destinada a encorajar a prática da amamentação natural – sem gerar lucro, mediante a recompensa financeira ou material conferida à nutriz pelo leite doado. Contudo, faz-se necessário considerar a clara distância existente entre a intenção expressa na definição do modelo e o que o próprio modelo possibilitou na prática. [...] (ALMEIDA *et al.*, 2008, p.13).

Um BLH também é definido, segundo Mattar e Quintal (2008), como um centro de lactação especializado em promover, apoiar e proteger a amamentação, auxiliando particularmente as mães de prematuros que não podem amamentar seus filhos, devido à imaturidade, incluindo atividades de orientação preventiva e curativa de problemas mamários, prolongamento da amamentação e indução da lactação.

Segundo o manual do Ministério da Saúde (MS), BRASIL/MS (2006; 2008) o BLH executa atividades de coleta, estocagem, análises, processamento e distribuição do LH pasteurizado, processos realizados de forma criteriosa, de acordo com as normas vigentes desde 1988, pela Portaria 322 do MS, que regulamenta a implantação e funcionamento para BLH em âmbito federal. A Resolução da Diretoria Colegiada, RDC 171, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) 2006, orienta os gestores e profissionais de BLH para que adaptem o serviço de acordo com as normas, em sua estrutura, processamento, equipamentos, controle de saúde, registros e controle rigoroso da qualidade com o LH (BRASIL, 2008).

O controle de qualidade da manipulação do LH coletado ou ordenhado está bem estabelecido e difundido em todo Brasil, e inicia-se desde as condições de instalação onde o leite é ordenhado, capacitação dos funcionários, exames de saúde dos funcionários, orientações às doadoras, enfim, da doadora ao receptor.

Grazziotin (2012, não publicado)² reforça em suas aulas nos cursos de capacitação em BLH que a manutenção da qualidade do LH doado começa no cuidado desde a primeira gota de leite retirada, no momento em que a mulher toca suas mamas para iniciar a coleta.

Para os profissionais que atuam em BLH, é exigido: curso de manejo clínico (20 horas); curso de aconselhamento em amamentação (40 horas), modelo proposto pela OMS/UNICEF/MS e o curso de processamento e controle de qualidade em BLH (40 horas) (BRASIL, 2008).

2.3.2 O fluxograma de funcionamento do BLH

Segundo o manual das normas para funcionamento, prevenção e controle de riscos em BLH (BRASIL/MS, 2008; PORTAL DA REDEBLH, 2013) são várias as etapas (Figura 2) pelas quais passa o LHOC antes de ser liberado para consumo, de modo que o leite distribuído por um BLH é seguro e não expõe o RNPT a riscos (MAYANS; MARTELLI, 1994; VIEIRA *et al.*, 2004; GUIMARÃES; NOVAK, 2005).

A qualidade microbiológica do LH, manipulado e processado pelo BLH está diretamente relacionada aos procedimentos técnicos e higiênico-sanitários adotados, desde a sua retirada da mama até o fornecimento ao RNPT (ALMEIDA *et al.*, 1998; BRASIL, 2008). O LHO de doadoras saudáveis é microbiologicamente inócuo. A presença de patógenos está associada à contaminação externa e deve-se às condições higiênico-sanitárias, de manejo e processos falhos (NOVAK *et al.*, 2001), portanto todo cuidado com a saúde da doadora e antissepsia em todas as etapas são fundamentais para obter-se um produto sem riscos.

² GRAZZIOTIN, M. C. B. **Curso da Iniciativa Hospital Amigo da Criança: processamento em BLH.** Hospital de Clínicas, UFPR, Curitiba, 2012. Informação verbal.

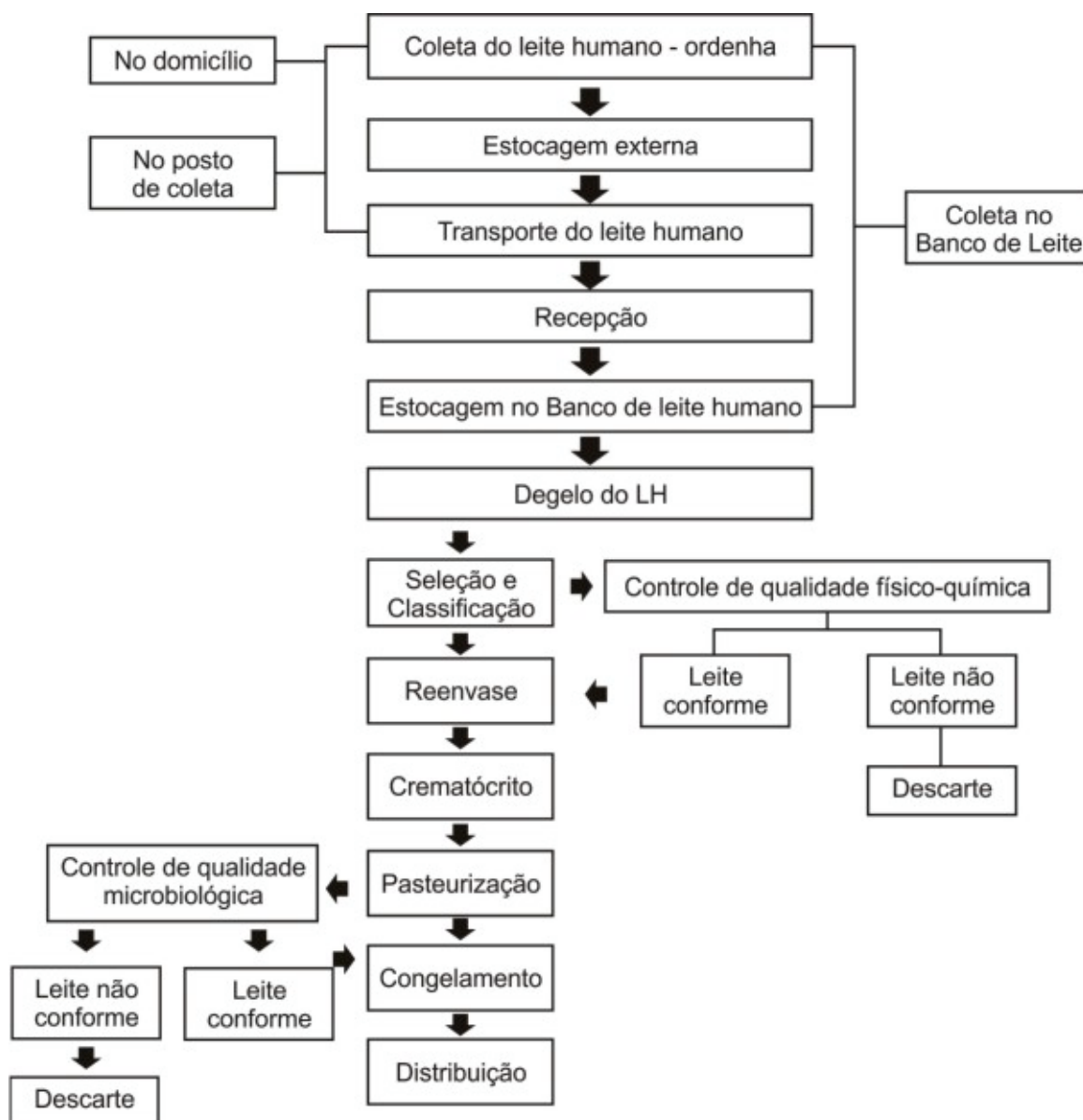


FIGURA 2 - FLUXO DO LEITE NO BLH

FONTE: PORTAL DA REDEBLH, (2013). Modificado pela autora (2013)

2.3.3 Doadora de leite humano

As nutrizes aceitas para doação são as que apresentam produção de leite superior às necessidades de seu filho, e desejam fazer a doação por livre e espontânea vontade. Pode ser doadora toda mulher em condições para amamentar seu filho e aquelas que temporariamente estão impedidas de amamentar por motivo de saúde do filho, como as mães de RNPT que se encontram em jejum ou com filhos internados em outras unidades hospitalares, e que ordenham o leite para manter a

estimulação (BRASIL, 2008; MATTAR; QUINTAL, 2008; MENCONI, 2010). As doadoras devem apresentar exames pré-natal e pós-natal compatíveis com a doação, não fumar mais que 10 cigarros ao dia, não usar medicamentos incompatíveis com amamentação, nem drogas ilícitas, podendo ser exigidos determinados exames, conforme o perfil epidemiológico da região (ANVISA, 2008; MENCONI, 2010; PORTAL REDEBLH, 2013). No BLH/HC/UFPR, é consenso da equipe, não aceitar leite de mulheres fumantes para repasse aos RNPT, independente de número de cigarros/dia. Somente são aceitos os leites das mães fumantes quando serão administrados exclusivamente para seus próprios filhos, e desde que o leite seja ordenhado após duas horas do último cigarro, conforme POP n.º 008, do BLH -HC-UFPR (GRAZZIOTIN, 2009, não publicado).³

A rBLH-BR (PORTAL DA REDEBLH, 2013) recomenda que a doadora receba toda orientação sobre a técnica de coleta e estocagem, de forma verbal e escrita, que pode ser um *check list* contendo os passos a serem seguidos para maior segurança, quando da coleta em domicílio (GRAZZIOTIN; GRAZZIOTIN; LETTI, 2010). A ordenha pode ser manual ou por meio de esgotadeiras manuais ou elétricas, desde que devidamente preparadas, como a sua lavagem com água e sabão, logo após cada uso, e fervidas por 15 minutos, totalmente mergulhadas no banho-maria, ou esterilizadas, quando em ambiente hospitalar e Unidade de Saúde. Estes procedimentos estão de acordo com a recomendação da ANVISA (BRASIL, 2006), segundo a qual a manutenção da lactação, através da extração manual, deverá ser a técnica de eleição, mas nos casos de dificuldade e para manter a produção com maior volume, poderão ser utilizadas as bombas de extração elétrica ou manual, obedecendo aos requisitos higiênicos sanitários.

O método de coleta do LH e sua influência sobre as propriedades e qualidade do LH tem sido objeto freqüente de estudos. Mitsue (2010) comparou a técnica de ordenha manual com a técnica com bomba tira leite, e concluiu que não houve diferença no grau de contaminação microbiana do leite ordenhado. Já Boo *et al.* (2001) em um estudo randomizado, concluíram que o LH ordenhado por meio de

³ GRAZZIOTIN, M.C.B. **Procedimento operacional padrão:** cadastro e orientação à doadora no domicílio. POP n.º 8, Arquivo BLH/HC/UFPR. Curitiba, 2009 (não publicado).

bomba apresentou uma taxa significativamente mais elevada de contaminação em relação aos leites ordenhados manualmente, quando as coletas foram realizadas em domicílio. Os autores citam que o fato ocorreu possivelmente devido à inadequada higienização e deficiente esterilização das bombas, como também a não supervisão durante o procedimento. Quando os leites foram coletados no hospital, não houve diferença entre os dois métodos de ordenha.

Fewtrell *et al.* (2001) concluíram que o valor calórico do leite não é afetado pelo tipo de ordenha e relatam que as mães que usaram bomba elétrica não apresentaram maior volume, quando comparadas com as que realizaram ordenha manual.

Já Garza *et al.* (1982) encontraram média mais alta na concentração de gordura total no LHOC obtido por bomba elétrica do que no LHOC obtido pela técnica manual, de 3,7% e 3,0% respectivamente, embora não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas. Os autores salientaram que as diferenças podem ser minimizadas se os métodos de coleta forem realizados mediante cuidados e sob condições de supervisão.

Pessoto, Marba e Cardoso (2010a) em estudo realizado em um BLH, avaliaram a produção láctea de mães de RNPT com peso inferior a 1.250 gramas ao nascer, no 5.º dia pós-parto e semanalmente até a 5.^a semana, usando três diferentes métodos de ordenha: manual, bomba manual, e bomba elétrica. A quantidade média diária por semana do leite ordenhado, nas 5 semanas de acompanhamento foi aumentando significativamente ao longo do tempo e foi significativamente maior quando obtido por bomba elétrica. A ordenha manual obteve volumes (mL/dia) estatisticamente inferiores, desde a primeira à quinta semana. Entretanto, não houve diferença de volume entre a ordenha por bomba manual e bomba elétrica. Os autores concluíram que a ordenha com bomba elétrica foi a mais eficaz no estabelecimento e manutenção da lactação nas mães desses RNPT.

Estes autores também analisaram o valor calórico pela técnica do crematócrito, e a acidez *Dornic* pelo método de titulação, usados em BLH e obtiveram como resultados, no leite ordenhado no 5.º, 7.º, 14.º, 21.º, 28.º e 35.º dias após parto, a mediana do valor calórico de 58,0 kcal/100mL, e não foi evidenciada diferença estatisticamente significativa ao longo do tempo e entre os 3 tipos de ordenha. Quanto à análise da AD nesses leites, os autores relataram média de $1,7 \pm 1,1^{\circ}\text{D}$ na ordenha manual, $1,9 \pm 1,2^{\circ}\text{D}$ na ordenha com bomba manual e $1,8 \pm 1^{\circ}\text{D}$ com bomba

elétrica ($p=0,3752$). Os autores concluíram que, independentemente do tipo de ordenha, não houve alteração da qualidade físico-química do LHOC.

Quanto ao local para ordenha mamária no domicílio, este deve ser o mais limpo da casa, longe de banheiros, ou seja, em ambientes que apresentem condições higiênico-sanitárias satisfatórias, isentos de fatores de risco que levem à ocorrência de não conformidades no LHOC, com rigor capaz de garantir a manutenção da sua qualidade (ANVISA, 2008).

A ordenha intra-hospitalar pode ser na enfermaria, em um posto de coleta ou mesmo na unidade neonatal, próximo ao berço do RNPT, desde que seguidas as normas de higiene e proteção (BRASIL, 2008; MATTAR; QUINTAL, 2008).

Os cuidados de antissepsia são considerados importantes no controle de qualidade do leite, uma vez que, se não for bem realizada, o leite poderá apresentar contaminação por micro-organismos presentes nas porções mais externas da mama ou do ambiente (ASSIS NETO *et al.*, 2002), e sujidades e odores estranhos devido a sua capacidade de sorção (ALMEIDA, 1999a). Segundo o Protocolo Clínico, n.º 08 da ABM (2010) "Estudos tem demonstrado que o leite materno com menos bactérias no momento da extração desenvolve menor crescimento bacteriano durante o seu armazenamento, e tem mais altos níveis de proteínas comparados com leite que contem bactérias em abundância".

Segundo o Manual de Recomendações Técnicas para funcionamento em BLH/MS/Brasil (2008) e Grazziotin, Grazziotin e Letti (2010) é recomendado que se ofereça um ambiente tranquilo e, de preferência privativo, com boa acomodação da nutriz, sem odores fortes e propiciar o relaxamento da nutriz, estimulando pensamentos positivos. Os profissionais devem orientá-la a como fazer as massagens nas mamas, a pressão na região areolar, no caso de ordenha manual ou ensiná-la como adequar a esgotadeira elétrica, a fim de evitar dano à mama ou perdas do leite ordenhado. Antes de iniciar a coleta do leite, doadora deve retirar a blusa, sutiã, anéis, pulseiras, relógio, e outros adornos, colocar gorro e máscara, realizar a higiene das mãos e antebraços, com água e sabão, secar e usar o álcool 70%. A região dos mamilos e aréola, devem lavadas somente com água, não utilizando sabão para evitar ressecamento. Secar com toalha individual.

A higiene mamilo-areolar é adequada porque esta região representa a primeira fonte de contágio do LH, como também a extremidade dos ductos lactíferos que podem albergar micro-organismos que, na amamentação, são passados ao RN mas

não representam risco uma vez que, junto com o LH, ocorre a transferência dos fatores de proteção.

Quando se trata de estocar o LH para uso posterior, a qualidade pode ser melhorada com o descarte dos primeiros jatos de leite (BRASIL, 2008). Colocar o material a ser usado sobre uma mesa, após a limpeza da mesma com álcool a 70%. Ao abrir o frasco coletor, a tampa deve ser colocada com a parte interna para cima; massagear as mamas para facilitar a descida do leite e desprezar os primeiros jatos, um cuidado que visa diminuir os contaminantes microbianos presentes na pele e ductos mamilares, para reduzir ao máximo a contaminação bacteriana que produz lipases, proteases, descarboxilases, o que pode alterar a composição do leite, como a destruição dos fatores de proteção e deterioração dos aminoácidos, carboidratos e gorduras, alterando sua acidez e valor calórico (BRASIL, 2008; MATTAR; QUINTAL, 2008).

Conforme Scarso *et al.* (2006), a maior causa para o descarte de LH doado aos BLH, deve-se à alteração do grau de acidez, que chega a 20% do total que os BLH recebem da coleta externa, mesmo dos leites que são estocados com frascos oferecidos pelas próprias unidades. Segundo Assis Neto *et al.* (2002) em sua análise de LH recebido em um BLH, houve grande redução da contaminação microbiana após a implantação de medidas seguras na manipulação e estocagem quando comparado com o volume desprezado anteriormente.

Grazziotin, Graziotin e Letti (2010) também concluíram que houve redução no volume de descarte de leite doado a um BLH, após a aplicação de um *check list*, contendo o passo a passo a ser seguido pela doadora durante a coleta e estocagem do LH no domicílio, no ano de 2008, no qual todas doadoras receberam a orientação direta de uma técnica de enfermagem, quando comparado ao volume descartado no ano anterior a sua aplicação.

Ainda conforme normas da ANVISA, Brasil (2008), a coleta do leite deve ser feita diretamente no frasco estéril, entregue pelo BLH. Na impossibilidade imediata do seu fornecimento, a doadora domiciliar pode utilizar um frasco de vidro com tampa de plástico que tiver em casa, desde que previamente lavado, fervido por 15 minutos e seco espontaneamente sobre um pano limpo, antes de coletar o leite e, imediatamente após o término da ordenha, fechá-lo e colocá-lo no congelador ou freezer.

O leite das próximas ordenhas pode ser coletado em um recipiente de vidro (copo, xícara), igualmente preparado (lavado e fervido), de uso exclusivo para este fim e, após o término da ordenha, o leite colocado dentro do frasco que já possui

leite congelado das ordenhas anteriores, cuidando para que mantenha um espaço entre o último volume de leite colocado no frasco e a tampa, devido ao risco de rachadura por expansão do leite, causada pelo congelamento, como também para facilitar o manuseio durante o processamento no BLH, evitando perdas de volume.

Todo frasco com leite ordenhado deve ser devidamente identificado com nome completo da doadora, idade gestacional, data da coleta, tempo de lactação, e horário da coleta (PORTAL DA REDEBLH, 2013).

A partir do término da primeira coleta, deve-se pensar na cadeia de frio pois esta é a forma para garantir a qualidade do produto, diminuindo a proliferação de micro-organismos. Para ser doado a um BLH, o LH cru deve ficar sob congelamento por 15 dias no máximo, guardado em congelador ou freezer, à temperatura igual ou menor que -3°C , sendo ideal temperaturas inferiores a -18°C . Se for oferecido ao próprio filho, poderá ficar sob refrigeração por até 12 horas, a partir da coleta e estocado a uma temperatura de até 5°C . Não podem ser estocados com alimentos no mesmo compartimento, e devem estar sempre bem fechados para evitar que o leite absorva cheiro ou outros voláteis (BRASIL, 2008).

Kamiya e Ramos (2003), em um estudo realizado no BLH do Hospital da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMS), encontraram 100% de aprovação do volume do leite coletado na sala de coleta do BLH, e 59,6% do volume de LH coletado em domicílio foi descartado.

Os relatórios mensais do BLH da Universidade Federal do Paraná (UFPR), de janeiro de 2010 a dezembro de 2013, também mostraram 100% de aprovação do volume de LHOC coletado no BLH. No entanto, o volume de LH descartado, proveniente do domicílio, apresentou descarte de 9,02% na média dos últimos quatro anos (2010 a 2013), e em dezembro de 2013, este atingiu o mais baixo índice de descarte dos últimos anos, com 3,4% (IBERBLH, 2014, PORTAL HOSPITAIS BRASIL, 2014). Antes da aplicação do chek-list, o descarte de LHOC superava a marca de 20% do volume total recebido. Estes índices reforçam a importância de um ambiente adequado, com orientação e supervisão para a obtenção de um produto com melhor qualidade e segurança.

Com relação aos efeitos do resfriamento e congelamento sobre os componentes do LH, conforme a literatura clássica, o estudo de Sosa e Barnes (1987), no qual relatam que o LHOC pode ser estocado em temperatura ambiente,

por até 6 horas antes que ocorra um significativo crescimento bacteriano. Larson *et al.* (1984) sugeriram manter o LH cru refrigerado entre 3°C e 4°C para retardar crescimento bacteriano, a manutenção da estabilidade dos nutrientes, a preservação da viabilidade e função dos leucócitos e preservação da concentração das proteínas antimicrobianas. Garza *et al.* (1982) recomendaram o congelamento do LH entre 15°C e -20°C para preservação de nutrientes, como as proteínas antimicrobianas e para manutenção da atividade das vitaminas com propriedades antioxidantes tais como tocoferol e retinol, embora ocorra redução significativa de vitamina C e dos leucócitos. Forsgren (2004) recomendou para as mães portadoras do citomegalovírus, o congelamento de seu leite, embora parece não ser a solução, concluiu que as taxas da transmissão diminuem. Neste caso, a segurança total só é conseguida com a pasteurização do LH.

2.3.4 O transporte do leite humano ordenhado

O transporte do LH, mesmo a curtas distâncias, deve ser feito com todo rigor, seja da casa da doadora ao BLH ou da enfermaria ao BLH, e do BLH ao receptor na Unidade de Neonatologia. Deve ser sempre realizado em recipiente térmico, fechado, limpo, respeitando a cadeia de frio. Para leite congelado deve ser usado gelo reciclável, sempre a uma temperatura inferior a -1°C, e o tempo de transporte não pode ultrapassar seis horas. O gelo comum não é indicado pois representa fonte de calor e promove o descongelamento do LHO, uma vez que o seu ponto de congelamento é de -0,56°C e o da água é 0°C (BRASIL, 2008).

O LH refrigerado deve ser transportado na temperatura $\leq 5^{\circ}\text{C}$, mantida até seu destino final. Sabe-se que as baixas temperaturas reduzem ou inibem a multiplicação da maioria das bactérias e diminuem a atividade das enzimas degradativas (ARCURI *et al.*, 2006). Por questões de natureza microbiana e química, se não for mantida a cadeia de frio, pode ocorrer o crescimento bacteriano pelo uso da lactose pelas bactérias produtoras de ácido láctico, levando ao aumento da acidez do LHO, comprometendo a sua qualidade, diminuindo a biodisponibilidade do cálcio e fósforo e também ocasionar a redução do seu valor nutricional e protetor (SILVA, 2004).

2.3.5 A recepção e estocagem do leite humano no BLH

A recepção do LH doado ao BLH é realizada em local próprio, segundo as normas técnicas e deve disponibilizar pia com água corrente, álcool 70%, planilha de recepção para registros pertinentes, como nome da doadora, horário da coleta, data, temperatura, volume coletado, volume descartado e qualquer não conformidade que justifique o descarte do leite (BRASIL, 2008).

O profissional deve estar paramentado com avental, máscara, gorro e luvas e deve verificar a temperatura da caixa térmica, antes de abri-la. Deve haver observação rigorosa de cada frasco quanto a sua integridade, identificação completa, higiene, e se o frasco é compatível com o padrão exigido (frasco de vidro e tampa de plástico). Se houver excesso de gelo na parede externa do frasco, lavar rapidamente na água fria, corrente para remover o gelo, secar e passar álcool 70% e estocar no *freezer* destinado ao LHOC.

O LHOC deve permanecer no congelamento até o momento de iniciar o processamento, o que deve acontecer em até o 15.^o dia, a contar da data da primeira ordenha de leite colocado no frasco. O LHC refrigerado só é aceito no BLH nos casos em que a coleta foi feita em ambiente adequado, com supervisão e coletado imediatamente antes do transporte ao BLH, em recipiente isotérmico (CRUZ, 2008).

Os tempos estipulados para conservação em congelamento e refrigeração recomendados pela rBLH-BR (PORTAL DA REDEBLH, 2013), fazem parte da norma da ANVISA, (2008) e são os prazos de estocagem mais rigorosos do mundo, assim definidos experimentalmente, para o LHR cru de 12 horas sob refrigeração e de 15 dias sob congelamento. Para o LHOP, o prazo de estocagem é maior, sendo de 24 horas sob refrigeração e seis meses sob congelamento. A justificativa é devido à preocupação com os RNPT, uma vez que são mais frágeis e necessitam de um LH com preservação máxima de suas propriedades.

O BLH deve ter registro do estoque, dos tipos de leite (premature, colostro, transição, maduro), do grau de acidez e valor calórico de cada frasco, além do registro diário de temperatura máxima e mínima dos equipamentos usados para estocagem. O LHOC deve ser estocado em *freezer* exclusivo, separados dos *freezers* com leite pasteurizado, em ambientes distintos e identificado. O LHOP só

deve ser liberado para consumo após o resultado da análise microbiológica. Após descongelado, tem o prazo de 24 horas para ser consumido pelo RNPT, desde que conservado sob refrigeração a uma temperatura de até 5°C, não sendo recomendado permanecer na temperatura ambiente. No caso do LH cru, ordenhado na sala própria para coleta ou na Neonatologia, seu uso deve ser imediatamente ofertado ao RNPT ou refrigerado ($\leq 5^{\circ}\text{C}$) por até 12 horas, prazo máximo para seu uso, conforme a norma da rBLH-BR (LIRA; CRUZ, 2008).

De acordo com o Manual de Recomendações Técnicas para BLH, BRASIL/MS (2008) e da rBLH-BR (PORTAL DA REDEBLH, 2013), a temperatura limítrofe para a manutenção do LHOC, sob congelamento, é de -3°C , contando com uma margem de segurança, uma vez que o seu ponto de congelamento é de $-0,56^{\circ}\text{C}$. O ideal é que o LHOC seja congelado a uma temperatura inferior ou igual a -18°C , por até 15 dias.

2.3.6 O Degelo do leite humano ordenhado cru

O degelo é uma etapa também importante que exige rigoroso controle para que não seja a causa de perda valor nutricional e fatores de proteção, como também não sofra contaminação.

A técnica consiste em selecionar os frascos a serem pasteurizados e colocá-los em um banho-maria a 40°C , este deve possuir bomba de demanda para o movimento da água, e o nível da mesma deve ser mantido a 1 ou 2cm acima do nível do leite contido nos frascos. Durante o tempo de banho-maria, faz-se necessária a agitação dos frascos a cada 5 minutos, para a homogeneização do leite, e observar a presença de rachaduras ou sujidades no seu interior (HECK, 2011).

Os frascos devem ser retirados do banho-maria assim que restar uma pequena "pedra de leite", mais ou menos do tamanho de uma azeitona (entre 2 a 3 cm de diâmetro) no interior do frasco, para garantir que a temperatura não exceda o limite superior permitido (5°C). Logo após o degelo, deixar sedimentar o LH e, em seguida, movimentá-lo lentamente, observando se há sujidades como pelo, pele, insetos, dentre outras anormalidades que tornam obrigatório o descarte. Na sequência do processamento, até iniciar a pasteurização, o LH deve ser mantido frio, no máximo até 5°C de temperatura. Se houver muitos frascos para a etapa seguinte,

manter na temperatura ambiente, apenas o número de frascos suficiente para que o tempo de manejo não ultrapasse os 20 minutos (tempo de duplicação bacteriana). Os demais devem permanecer sob refrigeração, em geladeira ou em caixa térmica com água gelada, até que sejam colocados para as etapas seguintes. Todo leite descartado deve ser anotado em planilha própria com data, volume, identificação, causa do descarte (BRASIL, 2008).

2.3.7 Seleção e classificação do LHOC

Segundo o Ministério da Saúde, Brasil (2006; 2008) todo LH que der entrada no BLH deve ser submetido aos procedimentos de seleção e classificação antes de iniciar o processo de pasteurização. A seleção do LHOC é baseada em várias etapas e compreende a avaliação das condições de embalagem, a presença de sujidades, a cor e odor (*off-flavor*), a análise da acidez pelo método padronizado pela rBLH-BR, a titulação *Dornic*. Sua classificação compreende o período de lactação, a idade gestacional da doadora ao parto, o grau de acidez *Dornic*, e o valor calórico, medido pelo método conhecido como crematócrito.

2.3.7.1 Análise da sujidades, cor e odor (*off-flavor*)

A verificação das sujidades é realizada em vários momentos durante o processamento do LHOC, e já na recepção pelo BLH, é avaliado se o frasco está externamente limpo, íntegro, bem vedado, e se o LH está congelado. Outro momento dessa avaliação ocorre no início do processamento, após o degelo, antes da análise da titulação de acidez *Dornic*, quando o frasco com o LH é levemente agitado e exposto diante de uma luz. A terceira verificação acontece após aprovação pela análise da titulação da acidez *Dornic*, quando são reenvasados em campo de chama, durante o escoar do LH de um frasco para outro.

Com relação a sua cor, o LHOC possui variações que dependem do tempo de lactação, da dieta materna, do volume e tempo de extração do LH da glândula mamária.

O colostro geralmente é mais amarelado. O LH de transição vai mudando do amarelo para o branco, em vários tons no decorrer dos dias, até se tornar o leite maduro, que se apresenta semelhante à cor de "água de coco", no início da mamada ou da ordenha, mais rico em componentes hidrossolúveis. A cor branca-opaca, mais para o final da mamada, deve-se ao aumento da caseína, cálcio e gordura. Tons azulados ou esverdeados são causados por dieta rica em certos vegetais, alimentos ricos em riboflavina, e há registros de leite róseo ou róseo-alaranjado associados ao consumo de gelatinas, refrigerantes, enfim, alimentos que contenham corantes (BRASIL, 2008; SILVA, 2008).



FIGURA 3 - CORES NORMAIS DO LEITE HUMANO – BLH-HC-UFPR
FONTE: A autora (2013)

O LH é descartado se apresentar cores que estejam fora da gradação que vai desde o tom 'água de coco' até o amarelo intenso, e das cores intermediárias do tom azulado, esverdeado ao branco opaco. Devem ser desprezados LH apresentando cores como marrom-escuro, vermelho tijolo, que podem indicar a presença de sangue, pesquisado pela técnica do crematócrito, bem como a cor verde-escura, que pode ser causada pela presença de bactérias do gênero *Pseudomonas*. No entanto, para que o produto seja considerado impróprio para o consumo, é necessário que o analista tenha conhecimento da dieta da doadora, uma vez que a coloração do LH por pigmentos pode ser variável. A presença de corantes ou consumo de grandes quantidades de vegetais pela lactante, têm sido associados à coloração róseo-

alaranjada e/ou esverdeada. Além da dieta materna, o uso de medicamentos pode alterar a cor do leite (SILVA, 2008; PORTAL DA REDEBLH, 2013).

O LH apresenta o *flavor* primário e o *flavor* secundário, que se refere ao seu sabor e odor. O *flavor* primário é o normal do LHO. É resultante da relação cloreto/lactose, apresenta sabor mais adocicado no início da lactação e vai se tornando mais salgado com a passagem dos dias, sendo mais acentuado por volta do 5.º mês de lactação. O *flavor* secundário, quando ocorre alteração do sabor e odor, é conhecido como *off-flavor*, identificado quando ocorrem alterações na composição do LHO, pela incorporação de odores externos (ALMEIDA; GUIMARÃES; NOVAK, 2005).

O *off-flavor*, uma grandeza que mescla a percepção concomitante de odor e sabor, decorrente da incorporação de substâncias químicas voláteis provenientes do meio externo, também faz parte da triagem do LHO, antes de ser encaminhado para a pasteurização e é considerada uma etapa indispensável, que por si só, pode identificar alterações que levam ao seu descarte (PORTAL DA REDEBLH, 2013). Novak *et al.* (2008) em análise de LH descartado pelo controle de qualidade em um BLH, observaram a existência de relação entre a presença de *off-flavor* e a carga microbiana. Concluíram que há uma relação consistente entre a presença de *off-flavor* e elevadas contagens dos microrganismos nas amostras analisadas.

A análise do *off-flavor* é baseada no método sensorial. É necessário que o analista tenha conhecimento das alterações de odor que o LH pode apresentar, que não seja fumante e que não apresente alterações na sua capacidade sensorial (resfriado, rinites). No ambiente de estocagem, análises e processamento do LH, não podem ser usados produtos com odor (material de limpeza, por exemplo) nem mesmo perfumes por parte dos profissionais durante a sua permanência no setor. O LHO possui uma grande capacidade de sorção de substâncias voláteis, ou seja, absorve os odores do ambiente, como cheiro de tintas, produtos químicos, perfumes, e até cheiro de cigarro já foi percebido em frasco contendo leite ordenhado por doadora não fumante, porque durante a ordenha, havia pessoas fumando no mesmo ambiente (BRASIL, 2008; GRAZZIOTIN; GRAZZIOTIN; LETTI, 2010).

Os odores indesejáveis que são percebidos no LH, também podem ser decorrentes de alterações na composição devido à deterioração e contaminação por substâncias estranhas, exógenas e micro-organismos que levam à perda de sua qualidade, provocando modificações físico-químicas como a rancificação, proteólise,

fermentação da lactose, além da fixação do cheiro estranho. Testes aprovados revelaram odores do LH relacionados à deterioração de proteínas e o caracterizaram como cheiro de "peixe"; à deterioração dos lipídios, como cheiro de "sabão de coco"; à fermentação como cheiro de coalhada e à deterioração conjunta de proteínas e lipídios como cheiro de "ovo podre" (NOVAK; ALMEIDA, 2011).

Spitzer e Buettner (2013), apoiadas pelo governo da Alemanha, onde a norma padrão de recomendação para estoque do LHOC é de até seis meses em *freezer*, realizaram pesquisa de monitoramento das mudanças do odor do LHOC submetido ao congelamento de -19°C, com amostras em três momentos: do leite fresco, do leite congelado por 2 meses e por 6 meses. Os métodos foram de análise sensorial por cromatografia gasosa bidimensional de alta resolução de massa e espectrometria/olfatometria. Os resultados mostraram alterações mais intensas de odor nas amostras de leite congelado por 6 meses, quando comparadas às amostras congeladas por 2 meses, bem como maior aumento de odores destas amostras, quando comparadas às de leite fresco. Documentaram odores de peixe, cogumelo, odor metálico e de sangue. As autoras afirmam que os odores são gerados a partir da oxidação dos ácidos graxos e de processos enzimáticos. Em pesquisa anterior (2010), as mesmas autoras concluíram que a degradação oxidativa dos ácidos poliinsaturados (linoleico, araquidônico, docosahexaenóico) é a maior fonte de *off flavor* no LHOC, durante a estocagem e que a alteração do odor está relacionada à alteração da acidez do LHOC.

Estes aspectos constituem razões importantes para que o LH ordenhado a ser oferecido ao RNPT, receba o máximo de cuidado com a estocagem, considerando baixas temperaturas e por tempos reduzidos, para se evitar o processo oxidativo e enzimático que alteram o seu odor, comprometendo sua qualidade (SANDGRUBER *et al.*, 2012).

2.3.7.2 A análise da acidez do leite humano.

Análise utilizada nesta pesquisa, para avaliar a acidez do LH é considerada essencial para avaliação do LHOC e nenhum BLH pode prescindir desta técnica, segura, confiável, prática e com poucos custos. É um dos principais parâmetros para

garantir a qualidade do LHOC quanto à presença de contaminantes e alterações físico-químicas. A determinação da acidez em graus *Dornic*, como avaliação de qualidade foi proposta por Almeida e colaboradores em 1998, com o uso de uma técnica modificada da titulação ácida, a partir da técnica realizada como rotina de controle na indústria de laticínios. A modificação deveu-se à necessidade de amostragem volumetricamente menor que a empregada na rotina dos laticínios (PANICHI *et al.*, 2002).

A utilização de indicadores físico-químicos para controlar a qualidade do LH ordenhado é uma alternativa que compatibiliza o custo operacional com as exigências nutricionais dos lactentes (GUIMARÃES; NOVAK, 2005; BRASIL, 2008). A determinação da acidez do LH é o teste de seleção mais fidedigno para indicar se o leite foi ordenhado com cuidado higiênico, estocado e transportado adequadamente (CAVALCANTE; TELLES, 2002; CAVALCANTE *et al.*, 2005; NOVAK; CORDEIRO, 2007). Identificar o grau de acidez do LH é obrigatório no controle de qualidade nos BLH no Brasil. Este teste simples visa o controle de qualidade, avalia a manutenção das propriedades físico-químicas do LH cru e representa importante elemento para a seleção antes da pasteurização (NOVAK; CORDEIRO, 2007). Baseia-se que o LH recém-retirado da mama, apresenta como todo alimento, grau próprio de acidez considerado original, que varia de 1 a 4ºD graus, pelo método de titulação *Dornic* (BRASIL, 2008; EMBRAPA, 2013), mas logo após a ordenha podem ocorrer variações, sendo considerado adequado para consumo, até 8 graus *Dornic* (VIEIRA *et al.*, 2004; SILVA, 2004; GUIMARÃES; NOVAK, 2005; CAVALCANTE *et al.*, 2005; BRASIL, 2008).

Importante salientar que o LH é um produto lábil, com alta atividade de água, pH próximo à neutralidade e rico em nutrientes, o que o torna sensível ao calor, que pode lhe causar facilmente alterações e a proliferação de micro-organismos, especialmente dos que degradam a lactose, produzindo mais acidez, devido o aumento do ácido láctico e consequente diminuição do pH do LH. Os carboidratos são transformados em ácido láctico liberando no leite mais prótons (H^+), levando à precipitação da proteína. O próton H^+ desestabiliza a caseína e insolubiliza o cálcio no interior da caseína e eleva a acidez (GALHARDO *et al.*, 2002; PANICHI *et al.*, 2002).

Conforme Luzeau, Barróis e Odièvre (1983) e Almeida (1998), a acidez do LH é classificada como original e desenvolvida. A acidez original é a que resulta da presença dos constituintes normais, como as micelas de caseína e sais minerais, entre os quais se destacam os fosfatos e os citratos, dióxido de carbono, ácidos

orgânicos presentes no LH. Imediatamente após a ordenha, o LHO está praticamente livre de ácido láctico e sua acidez total pode ser considerada original. A causa principal que leva à acidez desenvolvida é decorrente da presença do ácido láctico, consequente à fermentação da lactose devido ao crescimento bacteriano, levando à acidificação do LH, o que pode reduzir a quantidade de lipídios, as calorias totais do LH ordenhado e os fatores de proteção, comprometendo seu valor calórico e imunológico (CAVALCANTE; TELLES, 2002; SERAFINI *et al.*, 2003; NOVAK; CORDEIRO, 2007).

Luzeau, Barrois e Odièvre (1983) e Cavalcante *et al.* (2005) também apontam que a acidez sofre alteração dependendo da presença de ácidos graxos livres no LH, devido à lipólise, que pode ser provocada por congelamento e descongelamento não adequados. Segundo Galhardo *et al.* (2002), a estocagem prolongada do LHO leva à oxidação lipídica, o que também altera o seu grau de acidez.

Segundo a Empresa Brasileira de Pecuária e Agricultura (EMBRAPA, 2013), a acidez natural do LHO varia entre 0,1 e 0,4%, é expressa como massa de ácido láctico (1 a 4°D) e corrobora com os autores acima, afirmando que a acidez aumenta através da hidrólise da lactose por enzimas microbianas (fermentação), levando à formação de ácido láctico. Se esta acidez desenvolvida for muito elevada, o LH torna-se impróprio para consumo, pois indica alta atividade microbiana. A cada molécula de lactose metabolizada são produzidas quatro moléculas de ácido láctico. O ambiente favorável ao crescimento da microbiota é o que permite a produção do ácido láctico e a progressiva elevação dos valores de acidez *Dornic* (NOVAK; CORDEIRO, 2007; BRASIL, 2008; EMBRAPA, 2013).

Para Roman *et al.* (2013) a acidez normal (a original) participa do processo de absorção do cálcio e fósforo, confere proteção intestinal através da redução do pH intestinal, dificultando o crescimento bacteriano. A acidez desenvolvida do LH leva ao aumento da sua osmolaridade, à diminuição da biodisponibilidade do cálcio e do fósforo presentes, e também desestabiliza as proteínas solúveis e as micelas de caseína, favorecendo a coagulação, a alteração do odor, o sabor e diminui o valor imunológico do LHO (BRASIL, 2008). Erickson, Gill e Chan (2013) em um estudo de acidificação provocada artificialmente no LH cru após congelamento e descongelamento mostraram diminuição de 76% nas células brancas, 56% na atividade da lipase e 14% da proteína total.

O LH é um sistema tamponante com baixa concentração de íon hidrogênio livre, e a quantidade total do ácido pré-formado somente pode ser obtida pela medida da acidez titulável e não pelo pH. Em condições normais, o LH tende a apresentar pH ligeiramente ácido, próximo ao da neutralidade, situando-se entre 6,5 e 6,9. Em virtude do sistema tampão, decorrente da composição do LH, para que ocorram mudanças nos valores do pH na ordem de 0,1 unidade são necessárias elevações consideráveis na acidez desenvolvida. Esse fato desqualifica o pH como indicador eficaz para detectar a acidez desenvolvida do LH, face à sua baixa sensibilidade (CAVALCANTE *et al.*, 2005).

No teste da acidez titulável, o hidróxido de sódio N/9 (NaOH), também conhecido com Solução *Dornic*, substância básica alcalina, é usado para neutralizar o ácido do LH. Utiliza-se ainda uma substância indicadora, a fenolftaleína 1%, que é usada para mostrar a quantidade do álcali que foi necessária para neutralizar o ácido do LH. O resultado é que o indicador permanece incolor, quando misturado com uma substância ácida, mas adquire coloração rosa, que se firma, em meio alcalino. Portanto, o álcali (NaOH N/9) é adicionado ao LH até que este adquira a coloração rósea, ou seja, uma reação estequiométrica entre a base e os constituintes ácidos presentes no LH, até que ocorra uma completa neutralização, o ponto final da reação. Cada 0,01 mL da solução de NaOH N/9 gasto no teste corresponde a 1ºD ou 0,1g de ácido láctico/L (HECK; FERREIRA, 2000).

É considerado mais adequado para o RNPT, o LH que apresenta menor alteração de sua acidez original. Roman *et al.* (2013) classificaram como de qualidade superior, o LH com AD menor que 4ºD, como de qualidade intermediária, o LH com AD de 4 a 7ºD e impróprio para consumo, o LH com AD igual ou superior a 8ºD. Os mesmos autores analisaram 105 amostras de LH de um BLH na Espanha, concluíram que a correlação entre acidez *Dornic* e crescimento bacteriano no leite doado por doadoras externas, é positiva, embora fraca, e reforçam a importância desta análise para seleção e o controle de qualidade do LH, como um método simples, econômico e seguro. Para Svensson *et al.* (2000), a acidez baixa libera o cálcio de seu local de afinidade e também ativa as lipases que hidrolisam os triacilgliceróis do LH em ácido graxos livres, como ácido Oleico, que forma junto com a alfa-lacotalbumina, um importante complexo protetor exclusivo do LH.

Novak e Cordeiro (2007) em estudo num BLH, com 200 amostras de LH cru antes da pasteurização, analisaram a população total de microrganismos aeróbios mesófilos e os valores de acidez *Dornic*, e observaram correlação positiva ($r=0,948$) e estatisticamente significativa ($p \leq 0,001$). Concluíram que a titulação de acidez *Dornic* é um método eficaz para avaliar indiretamente o crescimento bacteriano no LHO.

Mitsue (2010) examinou 76 amostras de LH cru de doadoras, ordenhado no domicílio, encontrou 11 amostras com contagem de ≥ 2.400 NMP/mL de coliformes fecais. Ao entrevistar as doadoras, relatou que uma não lavou as mãos antes da ordenha, 4 não usavam touca e nenhuma usou máscara. Das três amostras com 460 NMP/mL de bactérias, uma doadora não lavou as mãos e nenhuma usou máscara ou touca. Sobre outras amostras contaminadas, as doadoras revelaram que ferveram os frascos, mas não as tampas e, das 13 amostras com ≤ 3 NMP/mL de bactérias, todas usaram os frascos estéreis fornecidos pelo BLH. Constatou que o leite ordenhado nas casas, onde havia animais de estimação, apresentou maior contaminação, e 50 % das amostras com contagem de ≥ 2.400 NMP/mL de coliforme fecal, eram de doadoras que tinham tido diarreia antes do dia da ordenha do LH.

Silva e Almeida (2005) analisaram a relação entre acidez *Dornic* e o crescimento bacteriano no LHO cru a 37°C. Os resultados revelaram que, após 4 horas, o crescimento de mesófilos no leite maduro promoveu a elevação progressiva da acidez *Dornic*. Na amostra de colostro, o aumento significativo da acidez ocorreu apenas após 16 h de incubação, quando o crescimento bacteriano elevou-se 28 vezes do valor inicial, provavelmente porque o colostro sofre influência direta de seus fatores de proteção. Quanto mais elevada a acidez do LH, pior é sua qualidade, afirmam.

Um questionamento comumente feito pelas pessoas e profissionais de saúde é se o tipo de alimentos que a nutriz ingere, influencia sobre a acidez do LH. Não há estudos que possibilitaram provar correlação entre a alimentação da nutriz e o grau de acidez encontrados (SCARSO, 2008).

Outro cuidado importante para a conservação da acidez do LH, segundo Aprile e Feferbaum (2011), é a manutenção da cadeia de frio, que representa importante ação preventiva para a preservação da qualidade do LHO, pois tem o poder de impedir a proliferação dos micro-organismos e de manter a integridade da sua estrutura, impedindo que ocorram alterações físico-químicas, imunológicas, etc. Pesquisas do centro Iberoamericano da rBLH-BR indicam que, com os cuidados básicos de higiene, desde a retirada do LH da mama, seguindo o rigor das orientações técnicas

conforme o Manual de Rotina da ANVISA, (2008), sobre boas práticas no manejo do LH, é possível a obtenção de um LH cru com a qualidade preservada, bem próxima à original e com ausência de micro-organismos patogênicos.

2.3.7.3 A análise do valor calórico do LHOC

O valor calórico do LH é obtido por meio da análise conhecida como crematócrito. Este é um método de calorimetria proposto por Lucas *et al.* (1978), que permite o cálculo estimado do valor calórico do LHO (BRASIL, 2006). É uma técnica simples e rápida para a estimativa da concentração da gordura e valor calórico do LHO, fundamentada na técnica do hematócrito, que separa as gorduras pela força centrífuga e pela diferença de densidade, formando uma fração mais evidente, que é esbranquiçada ou amarelada, denominada de creme. Este ocupa a extremidade posterior do capilar, pois é mais densa. O soro, com aspecto menos viscoso, mais ralo, fica abaixo do creme, a porção sobrenadante. Almeida (1999a) e Silva (2004) citam que a fração emulsão, de menor densidade, tende a subir ao se colocar o LH sob centrifugação e a separar-se dos demais componentes, arrastando junto micelas de caseína, o que dá origem a um aglomerado denominado creme, a porção milimétrica que permite calcular valor calórico final do LH pelo crematócrito. Para Lucas *et al.* (1978), é a concentração da gordura que constitui a maior determinante do valor calórico do LH, também confirmado por outros autores (VIEIRA *et al.*, 2011; ABRANCHES *et al.*, 2014).

Segundo Almeida (1999a), a percentagem da fração creme é constituída pela gordura empacotada, envolta por uma membrana fosfolipídica, glóbulos muito pequenos, regularmente distribuídos pelo LH. Na membrana desses glóbulos podem ser encontradas as lipases e outras enzimas, além de diversos cofatores. Becker e Fiori (1983) também afirmam que o micrométodo mede a porcentagem de creme do LH, ou seja, suas calorias, com facilidade, sensibilidade e fidelidade, de execução rápida e demanda baixo custo. O crematócrito é uma técnica que pode ser usada na prática clínica, em pesquisa. Lucas *et al.* (1978) quando propuseram a avaliação do VC do LH pelo crematócrito, encontraram como resultado de sua pesquisa, uma relação linear entre o valor calculado de energia e o crematócrito. Os autores afirmaram:

"foi devido a relativa constância na contribuição de energia das proteínas e lactose no leite humano: isto ocorre parcialmente por causa da relação inversa entre a concentração de proteína e lactose e parcialmente devido a relativa estabilidade na concentração da lactose, que contribui muito mais no total da energia do leite humano que a relativa variação da concentração da proteína" e "assim a variação da energia do leite humano é praticamente toda devida à variação da gordura e portanto, o conteúdo de creme" (LUCAS *et al.*, 1978, p 1020, tradução nossa).

Wang *et al.* (1999) observaram ter o método do crematócrito uma forte correlação com a concentração de lipídios ($r = 0,82$) e o conteúdo energético do LH ($r = 0,86$), no estado fresco ou congelado e descongelado, não sofrendo inclusive alterações com o congelamento e descongelamento. Os autores concluíram que o crematócrito é uma medida útil para prever a concentração lipídica e o conteúdo energético no leite fresco e no leite descongelado. A variação do conteúdo energético do LH está intimamente ligada à concentração lipídica, não havendo relação com os carboidratos e proteínas, pois não observaram correlação significativa entre o crematócrito e a concentração de carboidrato e proteína. Também Lin *et al.* (2011) concluíram ser este método prático e preciso, ao analisarem amostras de LH de doadoras, mães de RNPT internados em Taiwan, na primeira pesquisa realizada na China com este objetivo. Meier *et al.* (2002) analisaram amostras de LHO fresco de 32 mães de RNPT, quanto à variabilidade do lipídio e da caloria e encontraram média dos valores de 5,08 gramas/mL (2,83 – 8,65) e 70,3 Kcal/mL (47,72 – 118,63) respectivamente. Estes autores também observaram uma forte relação linear entre o crematócrito e a concentração total de lipídios no LH ($r = 0,94$; $p < 0,001$).

Para se evitar erros no cálculo do valor calórico do LH, cuidados com o manejo do LH, devem ser rigorosos em cada etapa do processo de análise. Para exemplificar uma, entre as ações a prevenir erros, cita-se a agitação do frasco com o LH e seu aquecimento a 40°C, imediatamente antes da alíquotas no microcapilar e durante o transporte do LH, de um recipiente a outro, pois as moléculas de gorduras podem se aderir às paredes dos frascos (ALMEIDA; COSTA; NOVAK, 2002)

Para o cálculo, utilizam-se fórmulas (cap. Material e Métodos) que determinam o teor de gordura (g/dL) e o valor calórico total (Kcal/L ou Kcal/mL) do LH (SILVA, 2004; BRASIL, 2006). A análise do crematócrito permite classificar o LHO de acordo com o teor de gordura, a fim de ofertá-lo de modo mais adequado às necessidades dos RNPT (MATTAR; QUINTAL, 2008; PORTAL DA REDEBLH, 2013). Quanto maior o conteúdo de gordura, maior será o valor calórico, no entanto, será menor a

concentração de componentes imunobiológicos. O LH com baixo valor calórico é mais rico em substâncias protetoras que conferem proteção química e biológica no trato gastrointestinal do RNPT (ALMEIDA, 1999a; SILVA, 2008).

Nos hospitais que contam com BLH, procura-se escolher o LH com valor calórico segundo as necessidades destas crianças, e especialmente aos RNMBP, cuja avaliação do crescimento deve ser individualizada e de acordo com a sua idade gestacional, seu desenvolvimento fisiológico, a evolução clínica e a intervenção nutricional específica. A prioridade é ofertar o LH da própria mãe, mesmo nas instituições que possuem BLH, pois os estoques de LH com idade gestacional correspondente às necessidade de todos RNPT, são limitados e insuficientes para a demanda.

Segundo Schanler (1995), as vantagens do LME são devidas à qualidade da proteína e ao conteúdo lipídico que são ajustados ao RNPT. Barros *et al.* (1984), afirmam que, quanto menor é a idade gestacional da mãe ao parto, maior é o conteúdo proteico-lipídico do LH que ela produz, especialmente nas primeiras quatro a seis semanas após o nascimento.

Outra razão de importância, é o incentivo à participação direta da mãe na nutrição de seu filho, em oferecer seu próprio alimento, estimular a lactação e, tão logo a criança esteja em condições de sugar, será amamentada. Deve-se lembrar sempre que este é o elo fundamental para o vínculo materno-filial, é o caminho natural para uma qualidade de vida mais digna de saúde física, mental e social (BRAZELTON, 1988; BARBOSA, 1990).

2.3.8 O processo de pasteurização do LHOC

O LH que será fornecido ao RNPT deve ser seguro quanto a sua qualidade sanitária, e não apresentar micro-organismos em quantidade ou qualidade que possam causar agravos à saúde (SILVA, 2004). O processo aplicado ao LH para garantir esta qualidade é a pasteurização, tratamento térmico que visa a inativação de 100% dos micro-organismos patogênicos e 99% da flora saprófita, através do binômio temperatura/tempo de 62,5°C/30 minutos (PORTAL DA REDEBLH, 2013; HECK, 2011).

O processo de pasteurização é um dos pontos críticos de controle de qualidade, cujo resultado final depende de todos os cuidados realizados com o LHOC nas fases anteriores a este, começando pela ordenha, pré-estocagem, transporte, análises prévias até o LH aprovado chegar a esta etapa. O monitoramento deve ser contínuo, pois a pasteurização não melhora a qualidade, nem reverte as alterações ocorridas nas fases anteriores (ALMEIDA, 1999b).

O processo de pasteurização foi testado para inativar a bactéria *Coxiella burnetti*, o micro-organismo patogênico mais termo-resistente que pode se desenvolver no leite de vaca (raro no LH). Uma vez observado o binômio temperatura de inativação e tempo de exposição, capaz de inativar esse micro-organismo, pode-se assegurar que os demais patógenos também serão termicamente inativados (BORGIO *et al.*, 2005; BRASIL, 2008). Este procedimento deve seguir com rigor as normas do Ministério da Saúde, ANVISA e rBLH-BR, para garantir que as perdas ocorridas pelo aquecimento e resfriamento sejam as mínimas possíveis.

O local onde o processamento é realizado, deve ser limpo e reservado. A pasteurização deve ser realizada por profissional da saúde capacitado em curso específico para os procedimentos em BLH.

A pasteurização é necessária, considerando que não se pode garantir uma coleta domiciliar em condições rigorosas de higiene. Assim, opta-se por oferecer um produto seguro, mesmo que com níveis nutricionais e protetores um pouco menores do que o LH sem tratamento, o qual oferece risco ao RNPT. O LH pasteurizado pode ser administrado para qualquer criança, cuja indicação médica ou de nutricionista siga os critérios de distribuição previsto pela r-BLH-BR

A pasteurização do LHOC é considerada um processo lento, de tratamento suave e dá origem a algumas modificações. As perdas ocasionadas pela pasteurização variam de autor para autor. Em geral, a cor e o sabor permanecem invariáveis, bem como as proteínas, os hidratos de carbono, ocorrendo uma perda de até 25% dos fatores de proteção termossensíveis (HECK, 2011). Acontecem perdas ou redução de alguns constituintes, como a IgA, que sofre 20% de redução como afirmam Ford *et al.* (1977 *apud* VINAGRE; DINIZ, 2002, p.33). Evans *et al.* (1978 *apud* VINAGRE; DINIZ, 2002, p.33) afirmam que a lisozima é reduzida em 23,7%, a lactoferrina 56,8%, Imunoglobulina G(IgG) 34% e nenhuma perda de IgA. Wight(2001) encontrou perdas de até 30% na IGA e de até 65% de lactoferrina. Heiman e Schanler (2006) apontaram perdas de até 50% na IGA, de 65% na lisozima e lactoferrina, e perda total de

linfócitos. Vieira *et al.* (2011); Anderson *et al.* (2007); Borgo (2011) encontraram perdas significativas no teor de gordura e valor calórico do LH após a pasteurização em comparação com LH cru fresco.

As pesquisas citadas por Akré (1997), sobre os efeitos da pasteurização na composição do LH, revelaram que a IgA é reduzida em 30%, a IgM é destruída, a IgG reduzida em 1/3, lisozima em 23%, lactoferrina em 2/3, e os fatores do complemento, macrófagos, linfócitos, neutrófilos são destruídos, enquanto os lipídios, carboidratos e proteínas se mantêm estáveis.

Há ainda muitos estudos que analisaram os efeitos da pasteurização sobre os componentes imunológicos e nutrientes do LH. Oxtoby (1988), em seu estudo de revisão, concluiu que a pasteurização mantém uma porcentagem elevada de IgA secretora, IgG, lisozimas e lactoferrina, fatores importantes para a proteção dos RNPT, os elementos espécie-específicos. Carbonare *et al.* (1996) avaliaram os efeitos da pasteurização sobre colostro e LH maduro, e não observaram alterações na capacidade do LH pasteurizado inibir a aderência de *Escherichia coli* enteropatogênica às células epiteliais intestinais humanas. Anderson *et al.* (2007) concluíram que os RNPT alimentados com LH pasteurizado apresentam menor absorção de lipídios, menor ganho de peso e crescimento.

Embora a pasteurização apresente alguma desvantagem para a nutrição do RNPT, mesmo que o ritmo de ganho de peso seja mais lento, como citam algumas pesquisas (JENSEN, 1999; VINAGRE; DINIZ, 2002; ANDERSON *et al.*, 2007; SOUSA; SILVA, 2010), o processo é importante para a manutenção da qualidade microbiológica do LH, pois na falta do LM fresco, o LHOP é a opção ainda melhor quando comparada ao leite artificial.

2.3.9 A análise microbiológica do Leite humano pasteurizado (LHOP)

O controle de qualidade microbiológico do leite humano ordenhado praticado pela Rede BLH-BR segue a lógica preconizada para alimentos, que institui a utilização de microrganismos indicadores de qualidade sanitária. Nesse contexto, o grupo coliforme tem ocupado lugar de destaque, por ser de cultivo simples, economicamente viável e seguro, minimizando a possibilidade de resultados falso-negativos (NOVAK; ALMEIDA, 2002 *apud* BRASIL, 2008, p.139).

Após o processo de pasteurização, cada frasco é resfriado rapidamente a uma temperatura entre -10°C e -26°C , até que atinja a temperatura de geladeira (entre 1 e 5°C). Após são coletadas 4 alíquotas de 1 mL de leite, de forma independente e inseridas num tubo de ensaio com capacidade para 15 mL, contendo 10 mL de meio de cultura próprio e tubo de *Durham* em seu interior. Em seguida, o tubo é colocado sob incubação a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas, quando é feita a análise do resultado. A determinação da ausência ou presença de contaminação se dá se houver ou não a formação de uma bolha de gás no interior do tubo de *Durham*. Havendo a bolha, o teste é considerado positivo e a amostra deverá ser submetida a um teste confirmatório e, se novamente positivo, o LH deve ser descartado (NOVAK; ALMEIDA, 2002; BRASIL, 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Caracterizou-se como uma pesquisa observacional, analítica, de coorte, com coleta de dados prospectiva.

3.2 LOCAL E PERÍODO DE ESTUDO

O estudo foi realizado no HC-UFPR, nas dependências do Serviço de BLH, local onde ocorreu a coleta e análises das amostras do leite humano (LH).

O período de estudo foi de outubro de 2012 a setembro de 2014, sendo que a coleta das amostras de LH ocorreu de março a junho de 2013.

3.3 CASUÍSTICA

No estado do Paraná existem 10 unidades de BLH, a maioria ligada a instituições públicas de ensino, sendo que em Curitiba, um deles está no Hospital Universitário Evangélico e o outro no HC-UFPR. Estes BLH conseguem atender a sua demanda interna, mas raramente conseguem estoque para fornecer LH a outras instituições, a exemplo do que ocorre em praticamente todos estados brasileiros.

A produção no estado do Paraná em 2013 foi de 15.400 litros coletados de 13.500 doadoras, a distribuição de 10.880 litros a 7.961 RN. Foram realizados 15.000 atendimentos individuais e 22.000 visitas domiciliares (PORTAL REDEBLH, 2014). O Estado do Paraná está entre os que coletam maior volume de LH, e foi campeão no ano de 2008, no Brasil, tendo em vista a proporção de sua população e número de BLH, reconhecido pela rBLH-BR pela excelente produtividade.

A produção do BLH-HC-UFPR no ano de 2013 foi de 2.921 litros, provenientes de 1.748 doadoras, sendo distribuídos 1.739 litros para 741 RNPT. Foram realizados 1.472 atendimentos individuais em amamentação e 2.057 visitas domiciliares para coleta de LH.

Os RNPT se beneficiam particularmente do LH disponibilizado pelos BLHs. Dados recentes indicam que 11,7% de todos nascimentos no Brasil são prematuros, o que coloca o país na 10.^a posição entre os países com maiores índices de prematuridade no mundo (UNICEF/BRASIL, 2014). No Estado do Paraná, que totalizou 156.848 nascidos vivos em 2013, 10,52% foram prematuros, assim distribuídos: 65 RN com menos de 22 semanas de idade gestacional (IG), 2.287 RN com IG de 22 a 31 IG e 14.097 RN com IG de 32 a 36 semanas, totalizando 16.449 nascidos prematuramente no Estado. Em Curitiba, no mesmo período, houve 2.088 RNPT, sendo 9 com menos de 22 IG, 225 RN com IG de 22 a 31 semanas e 1.745 RN com IG de 32 a 36 semanas (SESA/PR, 2014).

O HC-UFPR é referência no atendimento terciário em Neonatologia para Curitiba e Região Metropolitana, mas recebe crianças provenientes de todo estado. Possui 25 leitos assim distribuídos: 10 de Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN), 10 de Unidade de Cuidados Convencionais (UCinCo) e 5 de Unidade de cuidado intermediário Canguru (UCinCa), nomenclatura conforme a Portaria n. 930 de Maio de 2012. Em 2013 totalizaram 670 internações. Tornou-se referência para o estado do Paraná em 2014 no método Canguru.

3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

As amostras de LH foram obtidas de mães que atenderam os seguintes critérios de Inclusão:

- a) mães com RN internados na Unidade de Neonatologia do HC-UFPR;
- b) mães que conseguiram obter o valor mínimo de 30 mL para a amostra;
- c) mães e/ou responsáveis que assinaram o Termo de consentimento livre e esclarecido.

3.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídas as amostras nos casos em que:

- a) mães que apresentaram sorologia positiva para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou outra condição clínica que impedisse o aleitamento materno;
- b) mães em uso de medicação que contra indicasse a amamentação;
- d) mães impossibilitadas de se deslocarem até o hospital;
- e) mães com alterações nas mamas que impedissem o seu manejo.

3.6 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Constituiu-se a população deste estudo, as 100 amostras de LH coletado de 100 mães com RN internados na Unidade de Neonatologia do HC-UFPR, independente da idade gestacional, que vieram ao BLH.

3.7 AMOSTRA E TÉCNICA DE AMOSTRAGEM

O número das amostras de LH totalizou 100 de doadoras selecionadas por conveniência, à medida que compareciam ao BLH para receber orientações sobre manejo com a lactação. Cada mãe correspondeu a uma amostra. Justificou-se o limite deste número porque o pesquisador observou que a partir da 40.^a amostra, os resultados das análises de acidez e valor calórico tornaram-se muito próximos e repetitivos.

3.8 HIPÓTESE DO ESTUDO

Considerando a natureza relacional do tipo de estudo observacional, de coorte, as variáveis tempo e modo de estocagem foram posicionadas como independentes e o grau de AD e o VC, como variáveis dependentes, as hipóteses de nulidade e alternativa, foram assim constituídas:

- H0: O grau de acidez e valor calórico do LHOC não sofre alteração quando este é submetido à refrigeração por 12 horas ou ao congelamento por 15 dias em relação ao tempo zero, modo leite fresco.
- H1: O grau de acidez e valor calórico do LHOC sofre alterações quando este é submetido à refrigeração por 12 horas e ao congelamento por 15 dias em relação ao tempo zero, modo leite fresco.

3.9 VARIÁVEIS DO ESTUDO

3.9.1 Variáveis dependentes

As variáveis dependentes foram o grau de AD e o VC do LHOC.

3.9.2 Variáveis independentes

As variáveis independentes foram o modo e tempo de estocagem (fresco em tempo zero; refrigerado por 12 horas; e congelado por 15 dias) das amostras de LHOC.

3.9.3 Variáveis interferentes

As variáveis Interferentes foram relacionadas às condições do refrigerador e freezer, onde foram estocadas as amostras até sua análise e à manutenção da temperatura ideal de refrigeração e congelamento, às quais estiveram sob rigoroso controle diário, de 12 em 12 horas, assegurando-se a estabilidade das mesmas com o uso de gerador próprio do HC, instalado no BLH.

Outras variáveis interferentes referem-se aos reagentes utilizados para as análises do LHOC, a data de vencimento dos produtos e o seu preparo adequado, conforme padrão para análise de LH estabelecido pela rBLH-BR (fenoftaleína 1% e hidróxido de sódio 0,9 N), o qual esteve sob responsabilidade do laboratório central do HC-UFPR, além da conservação dos produtos reagentes ao abrigo da luz e calor excessivo, com volume suficiente para coleta de todas amostras necessárias para esta pesquisa.

Também consistiram em variáveis interferentes, os equipamentos utilizados para análises, os quais foram adquiridos pela pesquisadora para que pudesse realizá-las a qualquer tempo, sem depender dos equipamentos do BLH que poderiam estar ocupados no momento necessário. A pesquisadora responsabilizou-se pela a quebra, danos, falhas no funcionamento e interrupção das análises (agitador tipo *vórtex*, acidímetro de *Dornic*, microcentrífuga e pipetador).

O cuidado com a conservação da amostra para que não ocorresse perda do volume do leite, perda total da amostra ou de uma das subdivisões, o cuidado para evitar a quebra de microcapilares contendo a amostra, a correta identificação, a fim de evitar troca dos microcapilares e confusão de resultados.

3.10 PROCEDIMENTOS E MATERIAIS DO ESTUDO

A captação das doadoras para coleta da amostra de LH deu-se seguindo a rotina do BLH, a qual prevê diariamente a visita de uma técnica de Enfermagem ao Alojamento Conjunto, em busca das mães com RN internados na Unidade de Neonatologia, a fim de realizar a orientação sobre AM e para produção láctea. As mães

foram convidadas a irem ao BLH, assim que suas condições de saúde permitissem. No BLH, elas receberam apoio individualizado sobre a coleta, aprenderam a técnica de ordenha manual e/ou com esgotadeira. As mães que mostraram dificuldades, receberam maior número de visitas dos profissionais do BLH, quando ainda internadas. Para aquelas que não estavam internadas no HC-UFPR, foi deixada mensagem na incubadora/berço do RN para que elas se dirigissem ao BLH.

O acolhimento no BLH foi realizado sempre por profissional da Enfermagem, que durante esta pesquisa, avisou a pesquisadora da chegada da mãe, possível doadora de amostra, e esta a acompanhou para o preparo que antecipa toda coleta de LH, conforme a norma e rotina para BLH. Após acompanhar a paramentação e higiene de cada mãe doadora, realizar sua própria paramentação e higiene, a pesquisadora forneceu esclarecimentos sobre a pesquisa, realizou a observação sobre as condições emocionais da mãe doadora, a sua disposição para coleta e exame físico das mamas (integridade de pele, cor, dor, ausência de sinais flogísticos). Esclareceu sobre a importância da participação da mesma na pesquisa, objetivos e procedimentos. Após a doadora ter concordado e assinado o TCLE, foi coletado leite para amostra. A doadora foi acompanhada pela pesquisadora durante todo procedimento de coleta, e teve também o apoio de uma Auxiliar ou técnica de Enfermagem do BLH. A ordenha foi realizada pela mãe doadora com auxílio profissional, até que se obtivesse uma produção mínima de 30 ml, que constituiu cada amostra utilizada nesta pesquisa. Todas amostras foram coletadas no período da manhã, entre 08:00 e 12:30 horas, por ser o período em que a maioria das mães se faz presente no HC-UFPR, e devido à preocupação com o horário da análise das amostras após 12 horas em refrigeração, a fim de evitar que a pesquisadora tivesse que se deslocar de madrugada para esta análise.

As doadoras das amostras realizaram a ordenha manual e/ou com esgotadeira elétrica, seguindo todo rigor no cuidado higiênico e com material estéril, para não comprometer a qualidade do leite.

Foi observada a recomendação da RDC 171 (BRASIL, 2006) que determina a "...a extração manual deverá ser a técnica de eleição, mas nos casos de dificuldade e para manter a produção com maior volume, poderão ser utilizadas as bombas de extração elétrica ou manual obedecendo aos requisitos higiênicos sanitários".

Todas as doadoras das amostras de LH seguiram os passos da Norma Técnica para coleta de leite da ANVISA (2008) e pela rBLH-BR (PORTAL DA REDEBLH, 2013), descritas na sequência:

- Cada doadora da amostra retirou a blusa, *soutien*, vestiu um avental limpo, gorro, máscara, fez a higiene das mãos conforme padrão do Serviço de controle de Infecção Hospitalar (SCIH), que recomenda a lavagem com água e sabão, esfregando uma contra a outra e entrelaçando os dedos, em todas suas dobras até o punho, secando com papel toalha e passando álcool 70% após (Figura 4).
- Em seguida cada doadora passou uma compressa limpa, umedecida em água potável (torneira), sem sabão, em torno da aréola e mamilo, para remoção de possíveis descamações, pelos, sujidades, etc. e foi encaminhada da sala de higienização para sala de coleta, que fica ao lado, onde acomodou-se numa poltrona (Figura 5).
- A doadora iniciou a massagem manual na mama com movimentos circulares, intercalando com a pressão digital na aréola, para ordenha das primeiras gotas ou jatos de leite, desprezando-os e, em seguida, e passando seu próprio leite em volta dos mamilos e aréola. Seguiu com a ordenha manual e ou com esgotadeira elétrica. (Figuras 6, 7, 8).



FIGURA 4 - HIGIENE DAS MÃOS
FONTE: BLH-HC-UFPR, A autora (2013)



FIGURA 5 - HIGIENE DA MAMA, REGIÃO MAMILO-AREOLAR
FONTE: BLH-HC-UFPR, A autora (2013)



FIGURA 6 - ORDENHA MANUAL PELA DOADORA DA AMOSTRA
FONTE: BLH-HC-UFPR, A autora (2013)



FIGURA 7 - ORDENHA MANUAL REALIZADA PELO PROFISSIONAL
FONTE: BLH-HC-UFPR, A autora (2013)



FIGURA 8 - ORDENHA COM BOMBA ELÉTRICA
FONTE: BLH-HC-UFPR, A autora (2013)

Ao atingir o volume proposto de 30 mL, a amostra foi imediatamente encaminhada à sala de análises. Antes da subdivisão, o frasco com leite coletado foi agitado em agitador tipo *vortex* por 15 segundos para a homogeneização dos componentes do leite, e assim desprender a camada de gordura que pode ficar aderida à parede do frasco, ou na superfície do volume de leite, para que a amostra seja bem representativa e igualmente distribuída nos três frascos, que constituíram as amostras. A pesquisadora fez a separação em três porções que foram distribuídas em três frascos individuais, para serem estocados nos tempos e modos: fresco em tempo zero, analisado imediatamente; refrigerado por 12 horas à temperatura de 0,3 a $\leq 5^{\circ}\text{C}$ e congelado por 15 dias, à temperatura entre -18 e -26°C (Figura 9).

Cada frasco recebeu um número em sequência de 1 a 100, conforme seu modo e tempo de estocagem (Figura 10):

- a) o frasco leite fresco (LHF): **1F0**, sendo **1** o número da primeira amostra, **F** de modo fresco, **0** tempo Zero;
- b) o frasco refrigerado por 12 horas (LHR): **1R12h**, sendo: **1** o número da primeira amostra, **R** o modo refrigerado, **12h** o tempo de refrigeração em horas;
- c) o frasco congelado por 15 dias (LHC): **1C15d**, sendo **1** número da primeira amostra, **C** modo congelado e **15d**, o tempo congelamento em dias.

Toda amostra **F0** (modo fresco, tempo zero), foi imediatamente analisada e os resultados anotados na planilha específica. As amostras **R** (refrigerado) e **C** (congelado) foram estocadas conforme o modo e tempo estipulados, citados acima. Todas amostras foram identificadas conforme a sua sequência de coleta:

- a) segunda amostra: **2F0**, **2R12h** e **2C15d**;
- b) terceira amostra: **3F0**, **3R12h** e **3C15d**;
- c) quarta amostra: **4F0**, **4R12h** e **4C15d** e assim sucessivamente até a centésima e última amostra desta pesquisa: **100F0**, **100R12h**, **100C15d**.

As amostras foram refrigeradas em geladeira ou congeladas em freezer, de uso exclusivo para a sua estocagem, com termômetro digital de cabo interno e visor externo. O controle de temperatura devidamente registrada em formulário próprio, a cada 12 horas, durante os meses em que foram realizadas as coletas.

Os frascos de vidro com tampa de borracha ou plástico usados para as amostras foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos e etiquetados com dados identificando a amostra.

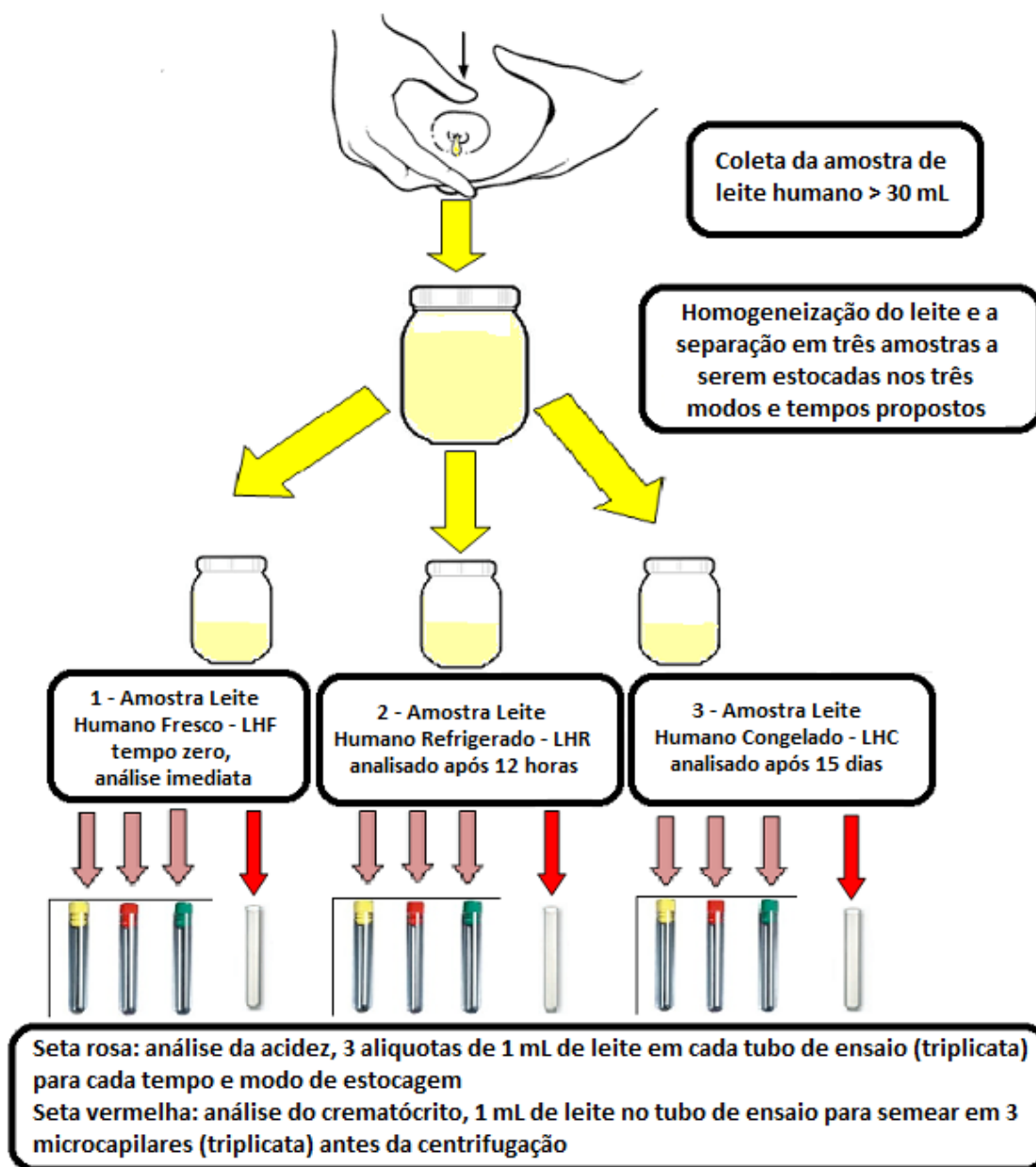


FIGURA 9 - FLUXOGRAMA: PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ESTOCAGEM E ANÁLISES DE ACIDEZ DORNIC E CREMATÓCRITO
FONTE: A autora (2013)



FIGURA 10 - FRASCOS ESTÉREIS PARA GUARDA DAS AMOSTRAS - NESTA FIGURA O MOMENTO DA AMOSTRA N.º 98
 FONTE: BLH-HC-UFPR, A autora (2013)

3.10.1 Equipamentos, materiais e soluções usados na pesquisa

3.10.1.1 Análise da acidez do leite humano cru

- Solução titulante Hidróxido de sódio 0,1N (solução *Dornic*), fatorada. Cada 0,01 mL gasto para neutralizar 1 mL de leite humano corresponde a 1ºD (*Dornic*);
- Solução indicadora de fenoftaleína hidroalcoólica a 1% em álcool 95ºGL (*Gay-Lussac*) neutralizada;
- Acidímetro de *Dornic*, com microbureta ao centésimo (escala de 0,01 mL) marca EME *Equipment* com certificação credenciada pela Rede Brasileira de Calibração n.º 17871/ 2012, Brasil;
- Agitador Tubos *Vortex*, marca *Biomixer*, modelo QL 901, série 1101040, Brasil;
- Pipeta automática para análise quantitativa, calibrado, para 1 mL;
- Ponteiras para 1 mL
- Estante para suporte, revestida em PVC para 24 tubos de ensaio

- Estante para suporte, revestida em PVC, para 40 tubos de ensaio;
- Tubos de ensaio para 5 mL;
- Frascos de vidro, pequenos capacidade para 50 mL, com tampa de borracha, esterilizados em autoclave em 121°C por 15 minutos;
- Recipientes plásticos para resfriamento/aquecimento das amostras;
- Gelo reciclável;
- Termômetro calibrado de -10 a 100°C;
- Frasco conta-gotas;
- Planilha para registro dos resultados,
- Canetas, adesivo para identificação das amostras, campos limpos, álcool 70%.

3.10.1.2 Análise do valor calórico (crematócrito) do leite humano cru

- Centrífuga para microhematócrito com *timer*; marca Microspin, modelo Spin 1000, velocidade RPM 12.000 fixa, série n.º 102154, Brasil;
- Pipeta automática manual;
- Ponteiras descartáveis;
- Estante para suporte, revestida em PVC, para tubos de ensaio;
- Agitador *Vortéx*, o mesmo para análise AD;
- Tubos de ensaio 5 mL;
- Tubos capilares sem heparina, 1,0 mm X 1,5 mm X 7,5 cm;
- Banho-maria termostatzado para manter temperatura em 40°C;
- Massa para selar os microcapilares, de várias cores;
- Régua graduada em frações de 1 mm;
- Estabilizador de voltagem (110/220).

3.10.1.3 Estocagem das amostras de leite humano cru

- Geladeira *duplex*, Marca Eletrolux, *Air Flow System* DC 38, Brasil;
- Termômetro digital com cabo interno e leitura externa, que foi realizada a cada doze horas, às 07 horas e às 19 horas;
- Planilha para anotação dos valores de temperaturas encontrados.

3.10.2 Procedimento para análise da acidez do leite humano cru

Para a determinação da acidez do LHOC utilizou-se como unidade de medida, graus *Dornic*, segundo a recomendação da rBLH-BR. Para as amostras com leite fresco (LHF), tempo Zero (F0), a técnica de análise da AD foi realizada da seguinte maneira: o frasco com amostra de leite foi homogeneizado no agitador (Figura 12) e após, pipetado 1 mL do leite em triplicata, semeado em três tubos de ensaio com capacidade para 5 ml (Figuras 13 e 14), mantidos em banho-maria com água gelada até o momento da análise, que foi imediata.

Em seguida, foi adicionada à alíquota de 1 mL de LH de cada tubo de ensaio, uma gota da solução indicadora de fenoftaleína (Figura 15). Foi então colocado sob a bureta do acidímetro de *Dornic*, procedendo a titulação gota a gota (Figura 16) tendo o cuidado em agitar o tubo a cada gota liberada, com movimentos suaves (Figura 17), para evitar a incorporação de ar ao LH e cuidando para que o gotejamento do NaOH fosse centralizado, não escorrendo pelas paredes do tubo de ensaio, a fim de evitar perdas do seu volume em contato com o LH e levar a um resultado alterado do grau de acidez.

O gotejamento da NaOH foi interrompido no momento em que houve a virada da cor original do leite, para coloração róseo-clara "rosa bebê" que se firma (Figura 18). Procedeu-se a leitura na bureta de *Dornic* até a virada da cor. Cada 0,01 mL de NaOH gotejado, corresponde a 1^oD, ou seja, se no tubo foram gastos 0,04 mL de solução, indica que aquela amostra de LH apresentou 4.^o *Dornic* (4 graus de acidez). Como foram análises em triplicata, o valor final considerado foi a média aritmética dos três valores obtidos na testagem individual de cada alíquota e multiplicado pelo

grau de fatoração da solução titulante (BRASIL, 2008; PORTAL DA REDE BLH, 2013). A solução NaOH usada nesta pesquisa apresentou grau de fatoração 0,94.

Para as amostras de LH mantidas sob refrigeração por 12 horas (LHR) e sob congelamento por 15 dias (LHC), seguiu-se a mesma técnica descrita acima, acrescentando-se, para as congeladas, a necessidade de realizar o descongelamento em banho-maria, com controle de temperatura no máximo de 40°C até estar totalmente em estado líquido. Estas amostras foram acompanhadas com um frasco teste com água e termômetro para o monitoramento da temperatura (Figura 11). Após descongelamento, foram colocadas em banho-maria com água gelada até o momento da análise de acidez.

As sobras de LHOC das amostras das análises da AD, foram descartadas na rede de esgoto, sem necessidade de tratamento prévio, devido a existência de sistema de tratamento da rede pública em Curitiba, conforme o disposto na RDC/ANVISA n.º 306/2004

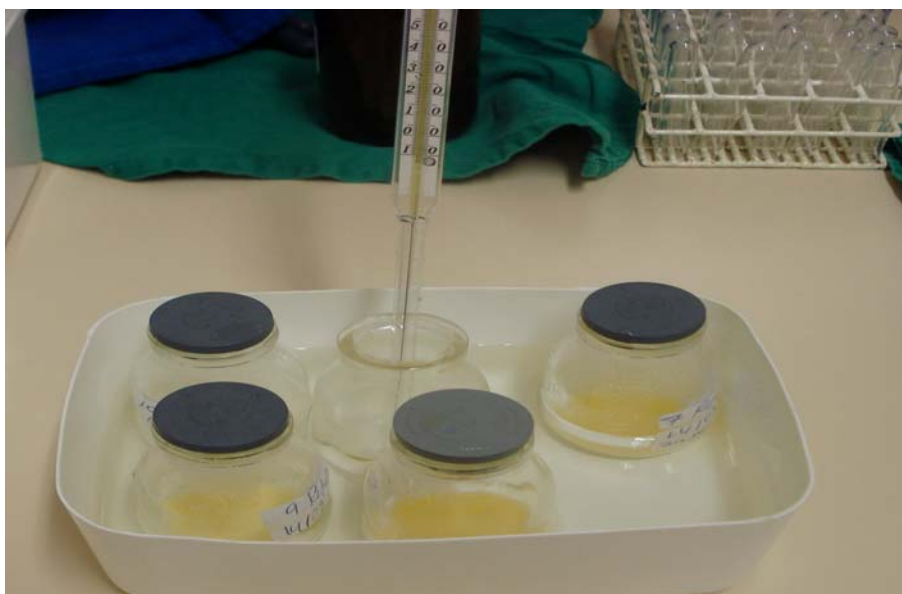


FIGURA 11 - AMOSTRAS SOB DESCONGELAMENTO ANTES DA ANÁLISE
FONTE: BLH-HC-UFPR, A autora (2013)



FIGURA 12 - HOMOGENEIZAÇÃO DA AMOSTRA EM VORTEX
FONTE: BLH-HC-UFPR, A autora (2013)



FIGURA 13 - A COLETA DA ALÍQUOTA DE LEITE PARA TITULAÇÃO DA ACIDEZ
FONTE: BLH-HC-UFPR, A autora (2013)



FIGURA 14 - COLETA EM TRIPLICATA, 1 ML EM CADA TUBO DE ENSAIO
FONTE: BLH-HC-UFPR, A autora (2013)



FIGURA 15 - GOTEJAMENTO DE FENOLFTALEINA 1 GOTA EM CADA TUBO
FONTE: BLH-HC-UFPR, A autora (2013)



FIGURA 16 - TITULAÇÃO DE ACIDEZ DORNIC – GOTEJAMENTO DE NAOH
FONTE: BLH-HC-UFPR, A autora (2013)



FIGURA 17 - TITULAÇÃO DE ACIDEZ DORNIC - NAOH
FONTE: BLH-HC-UFPR, A autora (2013)



FIGURA 18 - PONTO DE EQUIVALÊNCIA: A VIRAGEM DA COR
FONTE: BLH-HC-UFPR, A autora (2013)

3.10.3 Procedimento para análise do valor calórico do leite humano

No mesmo momento em que foram pipetadas as três alíquotas para a acidez, também pipetou-se mais uma alíquota de 1 mL em um quarto tubo de ensaio, identificado, para a análise do valor calórico, e esta foi conservada em banho-maria a 40°C até seu aquecimento para a realização da análise (Figura 19). Em seguida o tubo com o leite foi colocado no agitador, tipo *Vórtex*, por 15 segundos, a 2.800 rotações por minuto (Figura 20) e, então, fez-se a coleta no microcapilar, em triplicata, vedando-se uma das extremidades com massa de moldar (Figuras 21 e 22).

Os três microcapilares foram dispostos nos encaixes do disco da centrífuga, distribuindo-os de forma concêntrica, de modo a se manterem em equilíbrio durante a centrifugação e com as extremidades vedadas voltadas para fora. A centrifugação deu-se por 15 minutos, à 12.000 rotações por minuto, observando-se as instruções do fabricante indicada para realização do teste de crematócrito (Figuras 23 e 24).

Após a centrifugação com o uso da régua graduada, mediu-se o comprimento da coluna total e a parte concentrada da porção sólida (ocupada pelo creme) de cada

um dos três microcapilares. Os microcapilares foram descartados em recipiente para perfuro cortantes conforme o disposto na Norma Regulamentadora 32.

3.10.3.1 Obtenção do valor calórico de cada amostra

Após obter a medida da coluna total e do creme de cada um dos três microcapilares, consultou-se a tabela elaborada pelo autor conforme a tabela padrão da rBLH-BR (Anexo 06) utilizada em toda Rede Iberoamericana de BLH que contém todos valores de crematócrito pré-calculados possíveis em Kcal/L ou Kcal/100mL. Registrou-se na ficha própria os valores calóricos de cada um dos três microcapilares, calculou-se a média aritmética final e transformou-se em Kcal/100mL. O cálculo do crematócrito usado pela rBLH-BR:

- $\% \text{ de Creme} = \text{Coluna de Creme (mm)} \times 100 \div \text{Coluna Total (mm)}$
- $\text{Conteúdo calórico Total} = (\% \text{ de creme} \times 66,8 + 290) = \text{Kcal/litro}$



FIGURA 19 - AQUECIMENTO DAS ALÍQUOTAS PARA CREMATÓCRITO
FONTE: BLH-HC-UFPR, A autora (2013)



FIGURA 20 - ALÍQUOTA DE LEITE EM HOMOGEINIZAÇÃO
FONTE: BLH-HC-UFPR, A autora (2013)



FIGURA 21 - COLETA NO MICROCAPILAR EM TRIPLICATA
FONTE: BLH-HC-UFPR, A autora (2013)

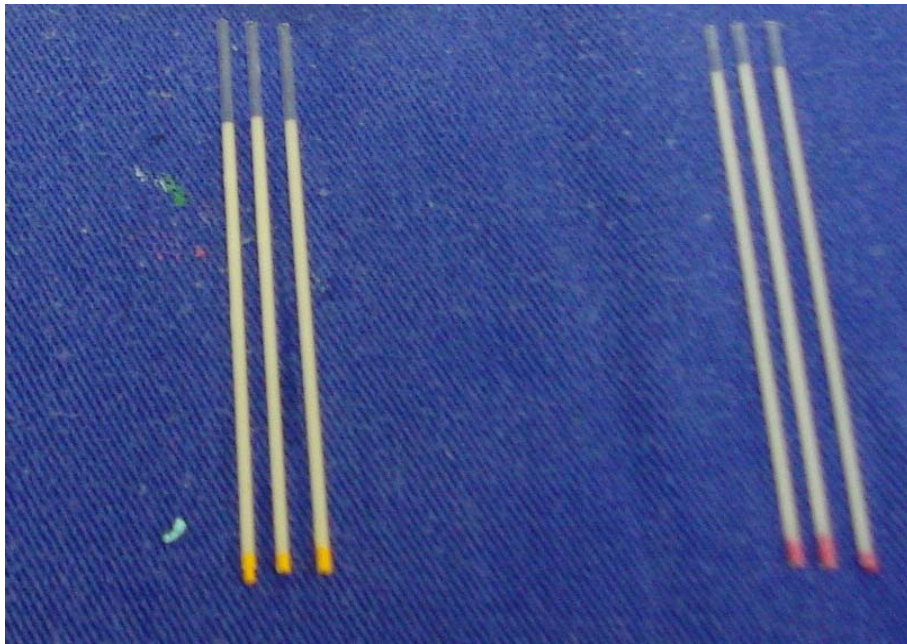


FIGURA 22 - MICROCAPILAR COM LEITE ANTES DA CENTRIFUGAÇÃO
FONTE: BLH-HC-UFPR, A autora (2013)



FIGURA 23 - MICROCAPILARES EM TRIPLICATA, ANTES DA CENTRIFUGAÇÃO
FONTE: BLH-HC-UFPR, A autora (2013)



FIGURA 24 - MICROCAPILARES APÓS A CENTRIFUGAÇÃO
FONTE: BLH-HC-UFPR, A autora (2013)

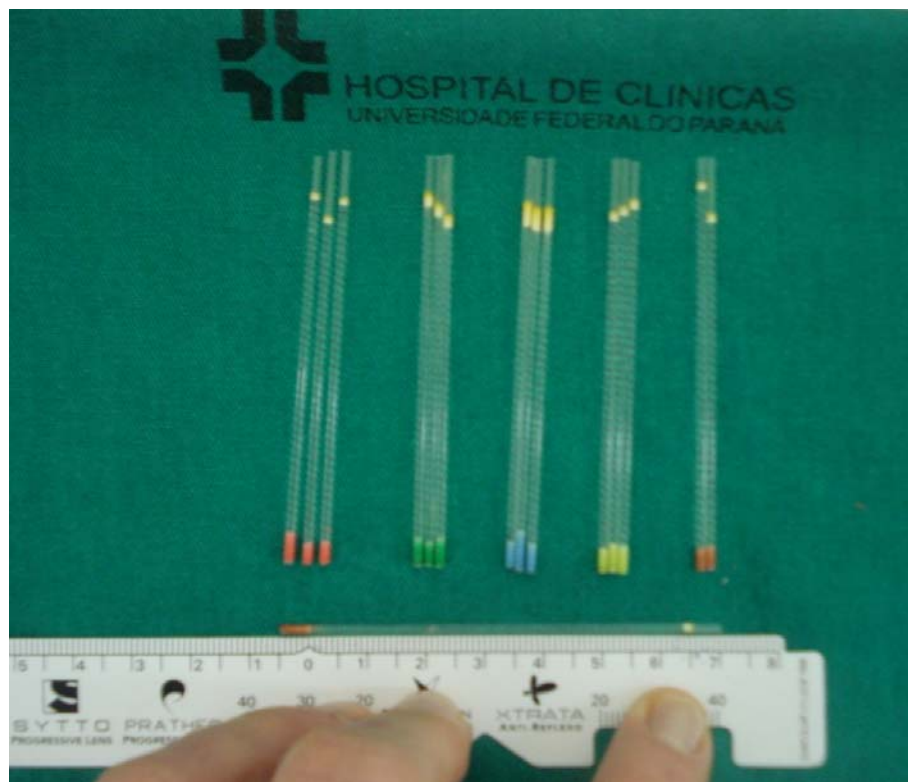


FIGURA 25 - MICROCAPILARES APÓS A CENTRIFUGAÇÃO, RÉGUA MILIMÉTRICA
FONTE: BLH-HC-UFPR, A autora (2013)

3.11 REGISTRO E GERENCIAMENTO

Os resultados foram registrados em planilhas específicas.

Ao final das 100 amostras coletadas e análises realizadas, em cada modo e tempo de estocagem (LHF, LHR, LHC), as médias finais foram registradas na planilha do excell, a fim de se obter a visualização geral dos resultados e facilitar a análise estatística.

Neste estudo os resultados dos valores calóricos mensurados no LHF, LHR e LHC, foram organizados em 04 faixas a partir do menor valor encontrado (39,0 Kcal/100ml), de maneira a torná-los comparáveis com a literatura.

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise descritiva foram determinadas as frequências e porcentagens das diversas variáveis qualitativas, e medidas de tendência central e dispersão (média, desvio-padrão, mediana, intervalo de confiança) para as variáveis quantitativas.

As variáveis respostas da pesquisa foram a AD e o VC do LHOC, analisados sob 3 tempos e formas de estocagem. Registradas em planilhas próprias e após o término de todas análises, foram repassadas pelo pesquisador na planilha do Excell.

Após análise global, os dados do estudo foram divididos em dois grupos para descrição e comparação: Grupo Prematuro e grupo Termo. O grupo prematuro foi constituído por todas amostras de LH obtidas de mães com IG inferior a 37 semanas e, o grupo termo, por todas amostras de LH obtidas das mães com parto de 37 ou mais semanas de IG. O teste de Friedman foi utilizado para verificar o efeito do tempo de estocagem nas variáveis respostas e o teste U de *Mann-Whitney* foi usado para comparar os dois grupos: Termo e Prematuro, dentro de cada tempo de estocagem.

Para verificar a existência de correlação entre AD e VC dentro de cada tempo de estocagem, o coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado. Em todos os testes foi utilizado um nível de significância de 5%. Foram usados os seguintes critérios para classificar a intensidade da relação: $<0,10$ nula; de $0,10 < 0,50$ fraca; de $0,50 < 0,70$ moderada e $\geq 0,70$ forte.

Para análise estatística, quanto à idade gestacional ao nascimento, neste estudo as doadoras das amostras foram classificadas de acordo com as categorias propostas pela literatura (FLETCHER, 1999; KENNER, 2001; OMS/UNICEF, 2009; CASTRO *et al.*, 2011; ZELKOWITZ, 2012) a saber: menor do que 37 semanas (até 36 semanas e seis dias) é classificado como parto prematuro. Os partos ocorridos de 37 a 41 semanas são considerados a termo; e quando maior ou igual a 42 semanas, pós-termo.

Os dados foram digitados em planilhas eletrônicas do programa *Microsoft Excel®* e analisados com auxílio do programa *Bioestat®*.

3.13 ÉTICA EM PESQUISA

O projeto de pesquisa obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR sob o n.º 65.121 e está registrado no CAAE sob o n.º 03333112.0.0001.0096. O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi obtido pelas doadoras antes da coleta da amostra de leite. Não houve rejeição por parte de qualquer doadora em participar da pesquisa.

3.14 MONITORIZAÇÃO DA PESQUISA

A pesquisa foi realizada considerando as medidas de proteção, minimização de riscos, confidencialidade, responsabilidade do pesquisador e da instituição, de acordo com o compromisso firmado com o Comitê em pesquisa sobre seres humanos da UFPR, na ocasião da submissão do projeto e através dos seguintes termos que foram assinados: Concordância dos serviços envolvidos, Termo de confidencialidade, declaração de tornar público os resultados, declaração de uso específico dos dados coletados, termos de compromisso para utilização de dados de arquivo.

3.15 FOMENTO PARA PESQUISA

A pesquisadora adquiriu alguns equipamentos com recursos financeiros próprios, como a microcentrífuga, microcapilares, acidímetro de *Dornic*, pipetador calibrado, agitador *Vortex*, ponteiras de um mL, regulador de voltagem. Esta decisão se deu a fim de não perder a oportunidade de coletar e analisar as mostras de LH no tempo exato conforme proposto para esta pesquisa, porque alguns destes equipamentos (do BLH) poderiam não estar à disposição da pesquisadora em todos horários que se fizessem necessários para as análises devido ao uso na rotina do serviço. Também adquiriu vários artigos nacionais e internacionais não disponíveis nas bibliotecas da UFPR nem via internet. Não houve financiamento ou bolsa para pesquisadora.

4 RESULTADOS

No período de março a junho de 2013, um total de 100 puérperas participaram com a doação de seu LH. Algumas características sobre as mesmas foram consideradas importantes e estão apontadas nos Gráficos 1, 2 e 3 e Tabela 1.

Em relação à idade das puérperas doadoras das amostras de LH, pode ser observado que a maior freqüência delas situou-se na faixa etária de até 35 anos completos (81%) e média de 28,0 (DP=5,0) anos. No entanto, a distribuição das doadoras pela idade cronológica evidenciou uma variação de 16 a 43 anos, com 8% de 16 a 19 anos, 73% de 20 a 35 anos, 15% de 36 a 39 anos e 4% com 40 ou mais anos de idade (Gráfico 1).

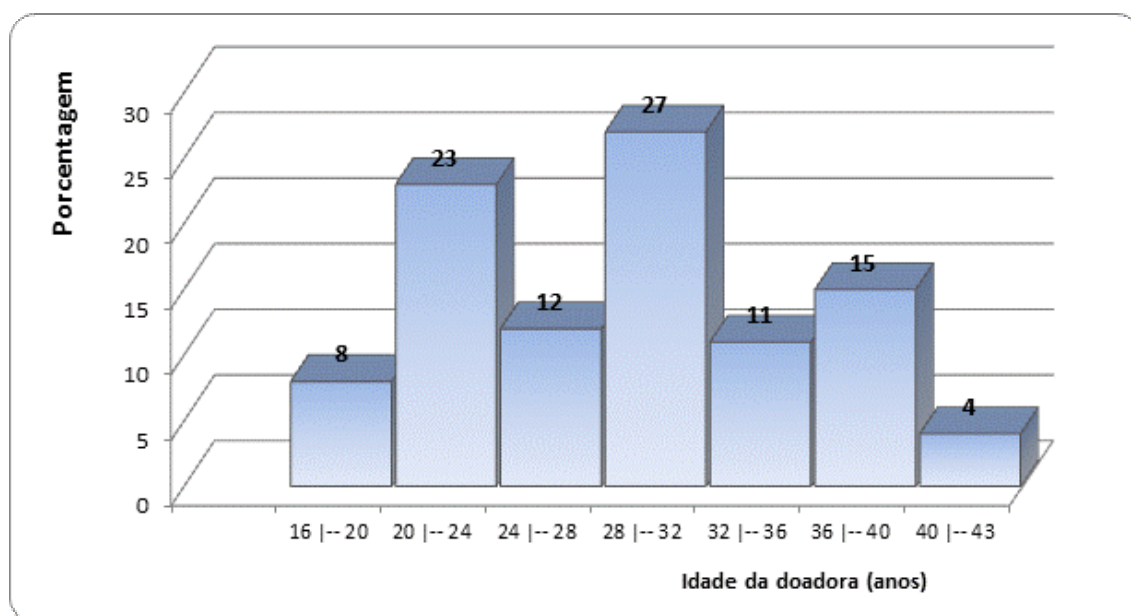


GRÁFICO 1 - DISTRIBUIÇÃO DAS 100 DOADORAS DAS AMOSTRAS DE ACORDO COM A IDADE CRONOLÓGICA

FONTE: A autora (2014)

Com relação à idade gestacional (IG) ao nascimento, observou-se que 9% das doadoras das amostras tiveram seu parto entre a 24.^a e 29.^a semanas e 42% tiveram parto entre 32.^a e 36.^a considerados nascimentos prematuros. A idade gestacional isolada prevalente nesta pesquisa foi de 37 semanas (20%). Pode-se observar que 49% das doadoras tiveram parto com IG entre 37.^a e 41.^a semanas considerados nascimentos a termo (Gráfico 2).

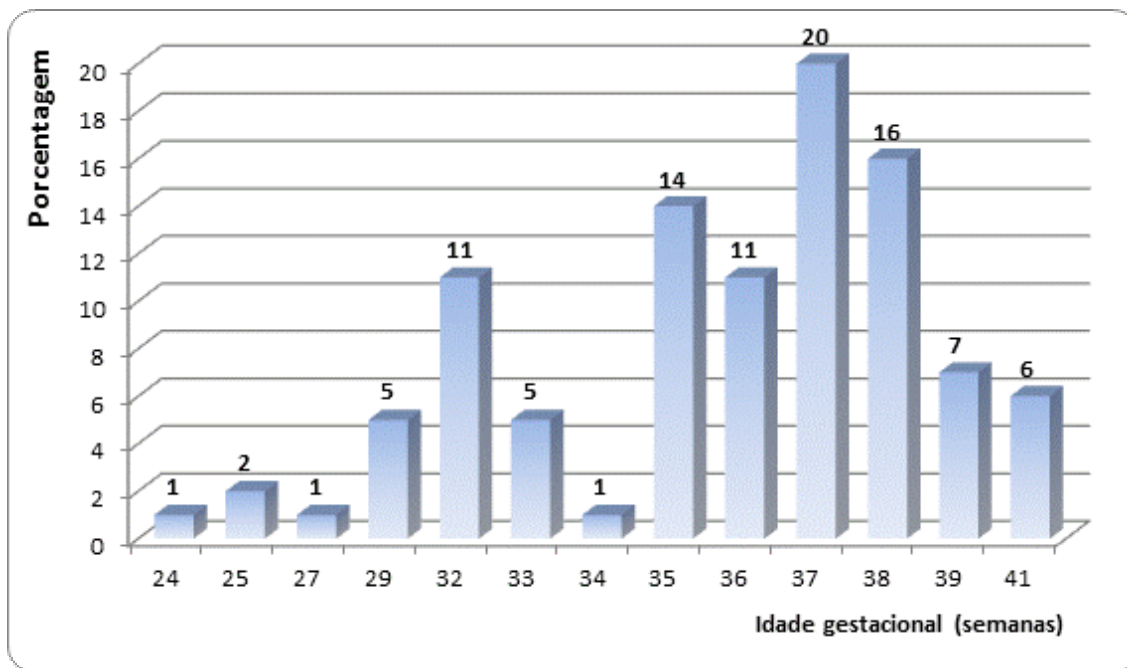


GRÁFICO 2 - DISTRIBUIÇÃO DAS DOADORAS DAS AMOSTRAS DE ACORDO COM A IDADE GESTACIONAL AO NASCIMENTO.

FONTE: A autora (2014)

Quanto ao tempo de lactação das doadoras das amostras, isto é, o número de dias do puerpério em que foi coletada a amostra para esta pesquisa, variou de 2 até 17 dias pós-parto, média de 6 ± 4 dias, intervalo de confiança (IC) [5,21 – 6,89] e mediana de 4 dias (Tabela 1). Conforme o gráfico 3, observou-se que a maior frequência ocorreu entre o 4.º e 5.º dias de lactação, com 52% das doadoras; seguida de 11%, para o 3.º dia e 8% no 2.º dia pós-parto, mostrando predomínio na primeira semana pós-parto. Os dados mostram uma diminuição acentuada no 6.º dia comparando-se aos dias anteriores, e a partir daí, o número de doadoras apresentou pequeno aumento e manteve-se mais ou menos constante até o 17.º dia.

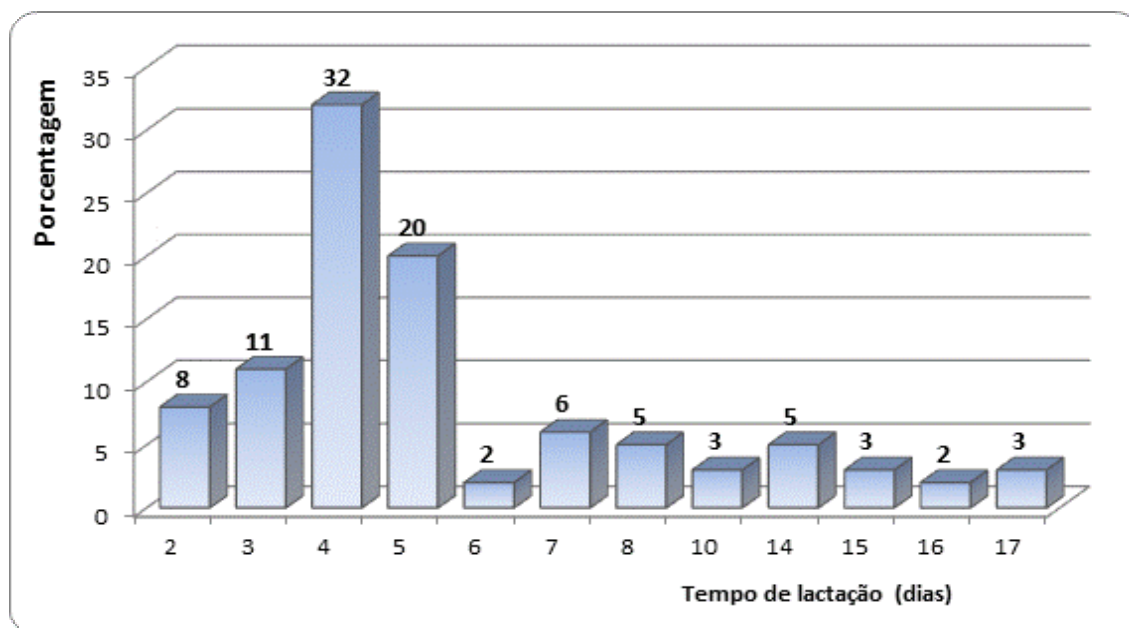


GRÁFICO 3 - DISTRIBUIÇÃO DAS DOADORAS DAS AMOSTRAS DE ACORDO COM O TEMPO DE LACTAÇÃO
 FONTE: A autora (2014)

Na análise da acidez do LHOC, para o LHF analisado imediatamente após a ordenha, observaram-se 93 amostras (93%) com valores de acidez original menor do que 4^oD e 7% das amostras com valores de acidez entre 4 e 4,4^oD. O valor em grau de AD mais frequente (25%) foi de 1,9 seguido por 20% das amostras com 3,8 (Gráfico 4).

No LHR observou-se que 81% das amostras apresentaram acidez com valores inferiores a 4^oD e 19% com valores entre 4 e 5,6^oD. O valor mais frequente de acidez (18%) foi de 3,8^oD, mas 63% do total apresentaram valores inferiores a este (Gráfico 4).

No LHC observou-se 82% das amostras com grau de acidez inferior a 4^oD e 18% entre 4 e 4,7^oD. O valor de acidez com maior frequência foi de 3,8^oD em 18% das amostras, mostrando resultados próximos aos observados no LHR (Gráfico 4).

Nenhuma amostra de LHOC apresentou resultado de AD igual ou acima de 6^oD em qualquer modo e tempo de estocagem.

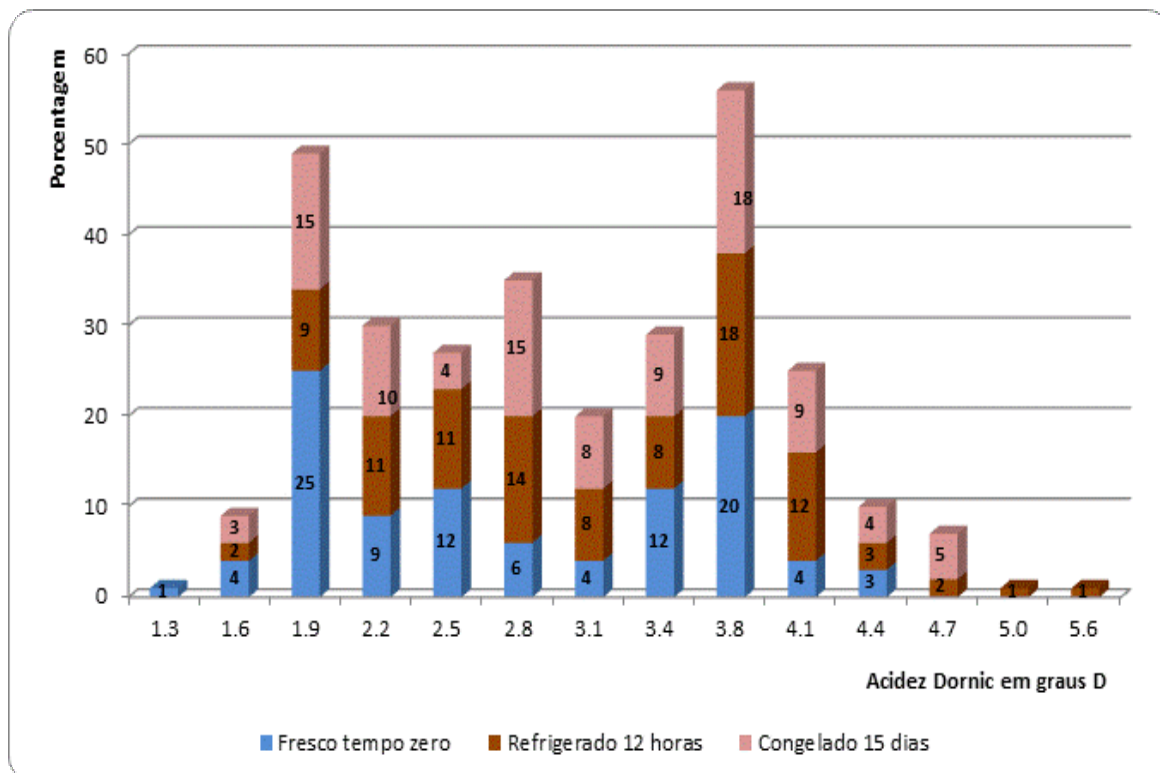


GRÁFICO 4 - DISTRIBUIÇÃO DA FREQUÊNCIA DOS VALORES DA ACIDEZ *DORNIC* DO LHC DE ACORDO COM OS TEMPOS E MODOS DE ESTOCAGEM, BANCO DE LEITE HUMANO, HC/UFPR, 2014

FONTE: A autora (2014)

No LHF observou-se que 63% das amostras apresentaram VC em Kcal/100mL inferior a 59,0; 23% apresentaram VC de 59 até 69,9 e 14% apresentaram VC igual ou maior que 70 (Gráfico 5).

No LHR observou-se que 67% das amostras apresentaram VC inferior a 59,0; 20% apresentaram VC de 59 a 69,9; e 13% apresentaram VC igual ou maior que 70.

No LHC observou-se que 65% das amostras apresentaram VC inferior a 59,0; 25% apresentaram VC de 59 a 69,9; e 10% apresentaram VC igual ou maior que 70.

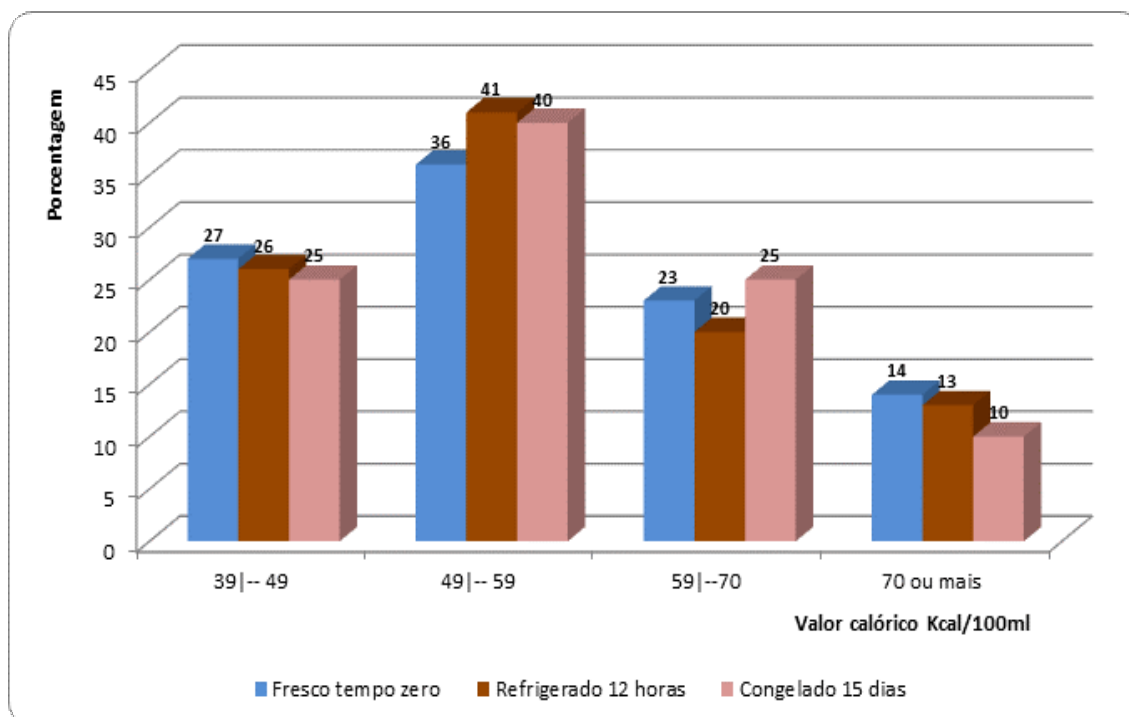


GRÁFICO 5 - DISTRIBUIÇÃO DA FREQUÊNCIA DO VALOR CALÓRICO DO LHC DE ACORDO COM OS TEMPOS E MODOS DE ESTOCAGEM.

FONTE: A autora (2014)

Quanto às características das amostras de LH (Tabela 1), observaram-se as seguintes médias na acidez: do LHF $2,8 \pm 0,9^{\circ}\text{D}$; na acidez do LHR e do LHC de $3,1 \pm 0,9^{\circ}\text{D}$. As medianas para a AD foram de $2,5^{\circ}\text{D}$ no LHF, e de igual valor ($3,1^{\circ}\text{D}$) no LHR e LHC com IC 95% [2,92; 3,28].

Para o VC em Kcal/100mL, a média no LHF foi de $56,5 \pm 15,8$; no LHR $55,8 \pm 14,1$ e no LHC $55,9 \pm 14,2$. As medianas para o VC revelaram-se muito próximas nos três modos e tempos de estocagem: 50,8 no LHF; 50,7 no LHR e 50,6 no LHC.

Os VC encontrados nas 100 amostras no LHF mostraram uma variação com grande amplitude, sendo o limite inferior de 39,0 Kcal/100mL e o superior de 124,1 Kcal/100mL. Para o LHR e LHC o limite inferior foi de aproximadamente 39 e superior de 116 Kcal/100mL. Em suma, os dados mostraram uma semelhança entre os atributos de AD e VC nas três modalidades e tempos de análise (Tabela 1).

TABELA 1 - NÚMERO TOTAL DAS 100 DE DOADORAS SEGUNDO O MENOR VALOR OBSERVADO (MIN) E O MAIOR VALOR OBSERVADO (Max), MÉDIA, MEDIANA (MED), DESVIO-PADRÃO (DP) E INTERVALO DE CONFIANÇA (IC[95%])

CARACTERÍSTICA	MIN	MAX	MEDIA	MED	DP	IC[95%]
Idade da doadora (anos)	16	43	28.0	29.0	5.0	[26,64; 39,32]
Idade gestacional (sem)	24	41	35.5	36.0	3.5	[34,80; 36,20]
Tempo de lactação (dias)	2	17	6.0	4.0	4.0	[5,21; 6,79]
AD fresco (°D)	1.3	4.4	2.8	2.5	0.9	[2,62; 2,98]
AD refrigerado (°D)	1.6	5.6	3.1	3.1	0.9	[2,92; 3,28]
AD 15 congelado (°D)	1.6	4.7	3.1	3.1	0.9	[2,92; 3,28]
VC fresco (kcal/100ml)	39	124.1	56.5	50.8	15.8	[53,36; 59,64]
VC refrigerado (kcal/100ml)	39	116.6	55.8	50.7	14.1	[52,99; 58,60]
VC 15 congelado (kcal/100ml)	39.2	116.1	55.9	50.6	14.2	[53,08; 58,72]

FONTE: A autora (2014)

NOTA: AD – acidez *Dornic*; VC – valor calórico.

Em relação ao tempo do nascimento (Tabela 2), observou-se que 49 doadoras tiveram parto a termo e 51 doadoras tiveram parto prematuro. Quanto à idade gestacional, observou-se uma média de $38,1 \pm 1,3$ semanas para as doadoras de termo e uma média de $33,0 \pm 3,1$ semanas para as doadoras de parto prematuro com diferença que se mostrou estatisticamente significativa ($p < 0,0001$).

Em relação ao tempo de lactação, quanto às doadoras de parto a termo, observou-se uma média de $7,2 \pm 5,2$ dias e mediana de seis dias após o parto para a coleta da amostra. Já para as doadoras de parto prematuro, a média foi de $4,9 \pm 1,8$ dias.

Quanto à idade cronológica das doadoras das amostras observou-se que para as 49 doadoras com parto a termo, a média foi de $24,9 \pm 4,6$ anos e para as 51 doadoras com parto prematuro, a média de idade foi de $30,9 \pm 6,8$ anos.

TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO E TRATAMENTO ESTATÍSTICO DAS AMOSTRAS, DO LEITE HUMANO RELACIONADAS AO TEMPO DE NASCIMENTO (TERMO E PREMATURO) SEGUNDO AS VARIÁVEIS MATERNAS

VARIÁVEL	TERMO		PREMATURO		P-VALOR ⁽¹⁾
	n	Média±DP	n	Média±DP	
Idade Gestacional	49	$38,1 \pm 1,3$	51	$33,0 \pm 3,1$	$<0,0001$
Tempo de Lactação	49	$7,2 \pm 5,2$	51	$4,9 \pm 1,8$	$<0,0045$
Idade da doadora	49	$24,9 \pm 4,6$	51	$30,9 \pm 6,8$	$<0,0001$

FONTE: A autora (2014)

(1) Teste T amostras independentes ou de Mann-Whitney.

A análise de distribuição das amostras de LHF, LHR e LHC para os valores de AD e VC de acordo com o tempo de nascimento (Termo *versus* Prematuro) é apresentada nas Tabelas 3 e 4. Os resultados das análises de AD e VC das 100 amostras do LHOC foram organizadas em três grupos: dois grupos organizados pelo

tempo de nascimento (grupo Termo compreendendo 49 amostras de LHOC e o grupo Prematuro com 51 amostras de LHOC e o grupo Global reunindo o total das 100 amostras.

TABELA 3 - DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE LHOC NO GRUPO GLOBAL E DAS AMOSTRAS SEPARADAS PELO TEMPO DE NASCIMENTO, PARA O GRAU DE ACIDEZ *DORNIC* ENTRE OS TRÊS MODOS E TEMPOS DE ESTOCAGEM EM CADA GRUPO

VARIÁVEL	GLOBAL		TERMO		PREMATURO	
	n	Média ± DP	n	Média ± DP	n	Média ± DP
AD LHF	100	2.8 ± 0.9 a	49	2.6 ± 0.8 a	51	3.0 ± 0.8 a
AD LHR	100	3.1 ± 0.9 b	49	3.0 ± 0.9 b	51	3.2 ± 0.8 b
AD LHC	100	3.1 ± 0.9 b	49	2.9 ± 0.9 a b	51	3.2 ± 0.9 b

FONTE: A autora (2014)

NOTAS: AD: Acidez *Dornic*. LHF: leite fresco;

Teste T de amostras independentes. ANOVA pelo FRIEDMAN (amostras pareadas, mesmo leite em diferentes momentos. Média sob a mesma letra indica diferença não estatisticamente significativa pelo teste de Friedman.

Quanto à análise de acidez para o grupo Global, observou-se média de $2,8 \pm 0,9$ para o LHF e de $3,1 \pm 0,9$ para o LHR e LHC. Houve diferença significativa entre o LHF em relação aos outros dois tempos e modos de estocagem, LHR e LHC, enquanto entre estes dois últimos a diferença não foi significativa.

Quanto à análise da acidez para o grupo Termo, observou-se uma média de $2,6 \pm 0,8$ para o LHF, de $3,0 \pm 0,9$ para o LHR e de $2,9 \pm 0,9$ para o LHC. Houve diferença significativa apenas entre LHF e LHR.

Quanto à análise da acidez para o grupo Prematuro, observou-se média de $3,0 \pm 0,8$ para o LHF, de $3,2 \pm 0,8$ para o LHR e de $3,2 \pm 0,9$ para o LHC. Houve diferença estatisticamente significativa entre o LHF em relação aos outros dois tempos e modos de estocagem, LHR e LHC, enquanto entre estes dois grupos não houve diferença estatisticamente significativa (Tabela 3).

TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE LHOC NO GRUPO GLOBAL E DAS AMOSTRAS SEPARADAS PELO TEMPO DE NASCIMENTO, PARA O VALOR CALÓRICO ENTRE OS TRÊS MODOS E TEMPOS DE ESTOCAGEM EM CADA GRUPO

VARIÁVEL	GLOBAL		TERMO		PREMATURO	
	n	Média ± DP	n	Média ± DP	n	Média ± DP
VC LHF	100	56.5±15.8 a	49	58.3 ± 14.8 a	51	54.8 ± 16.6 a
VC LHR	100	55.8±14.1 a	49	57.2 ± 13.0 a	51	54.4 ± 15.1 a
VC LHC	100	55.9±14.2 a	49	57.2 ± 13.9 a	51	54.6 ± 14.5 a

FONTE: A autora (2014)

NOTAS: VC: Valor calórico. LHR: leite fresco; LHR: leite refrigerado; LHC: leite congelado.

Teste T de amostras independentes. ANOVA pelo FRIEDMAN (amostras pareadas, mesmo leite em diferentes momentos. Média sob a mesma letra indica diferença não estatisticamente significativa pelo teste de Friedman.

Para as médias do VC em cada grupo, Global, Termo e Prematuro, entre os três modos e tempos de estocagem, observaram-se diferenças não estatisticamente significativas para qualquer análise (Tabela 4).

TABELA 5 - DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE LHOC RELATIVAS AO TEMPO DE NASCIMENTO, TERMO E PREMATURO, SEGUNDO A ACIDEZ E VALOR CALÓRICO EM CADA TEMPO E MODO DE ESTOCAGEM ENTRE OS DOIS GRUPOS

VARIÁVEL	TERMO		PREMATURO		P-VALOR ⁽¹⁾
	n	Média ± DP	n	Média ± DP	
AD LHF	49	2.6 ± 0.8	51	3.0 ± 0.8	0.003
AD LHR	49	3.0 ± 0.9	51	3.2 ± 0.8	0.279
AD LHC	49	2.9 ± 0.9	51	3.2 ± 0.9	0.047
VC LHF	49	58.3 ± 14.8	51	54.8 ± 16.6	0.101
VC LHR	49	57.2 ± 13.0	51	54.4 ± 15.1	0.136
VC LHC	49	57.2 ± 13.9	51	54.6 ± 14.5	0.293

FONTE: A autora (2014)

(1) P-valor referente ao teste Manny-Whitney comparando os grupos Termo e Prematuro em cada modo e tempo de estocagem.

Na comparação dos resultados das amostras de LHOC entre o grupo Termo e o grupo Prematuro, quanto às médias de AD para cada tempo e modo de estocagem, foi observada diferença estatisticamente significativa somente no LHF ($p=0,0030$) com a média da AD mais elevada no grupo Prematuro.

Com relação ao VC não foi observada diferença significativa em qualquer análise nos três modos e tempos de estocagem entre os dois grupos Termo e Prematuro. Observou-se as médias em Kcal/100mL mais elevadas para o grupo termo (Tabela 5).

Os resultados da análise de correlação entre as variáveis acidez e valor calórico são apresentados na Tabela 6.

TABELA 6 - COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE SPEARMANN PARA VALORES DE ACIDEZ DORNIC E VALOR CALÓRICO NOS DIFERENTES MODOS E TEMPOS DE ESTOCAGEM EM CADA GRUPO

	GLOBAL	TERMO	PREMATURO
AD fresco x VC fresco	$r = 0.2886$ ($p\text{-valor} = 0.0036$)	$r = 0.4133$ ($p\text{-valor} = 0.0031$)	$r = 0.2984$ ($p\text{-valor} = 0.0334$)
AD refrigerado x VC refrigerado	$r = 0.4287$ ($p\text{-valor} < 0.0001$)	$r = 0.5255$ ($p\text{-valor} = 0.0001$)	$r = 0.4263$ ($p\text{-valor} = 0.0018$)
AD congelado x VC congelado	$r = 0.4357$ ($p\text{-valor} < 0.0001$)	$r = 0.4595$ ($p\text{-valor} = 0.0009$)	$r = 0.4396$ ($p\text{-valor} = 0.0012$)

FONTE: A autora (2014)

NOTA: Critérios para classificar a intensidade da correlação, $\leq 0,10$ nula; $0,10 \leq 0,50$ fraca; $0,50 \leq 0,70$ moderada; $> 0,70$ forte.

Houve diferença estatisticamente significativa, mas a correlação apresentou-se fraca.

Quanto ao modo e tempo de estocagem LHF, a análise das amostras do LHOC no grupo Global mostrou uma relação fraca entre a AD e VC ($r = 0,2886$; $p\text{-valor} = 0,0036$). No grupo Termo, embora a relação ainda possa ser considerada fraca, foi a maior intensidade da relação observada nos três grupos para o LHF ($r = 0,4133$; $p\text{-valor} = 0,0031$). Nas amostras do grupo Prematuro a relação entre a AD e VC também foi fraca e significativa ($r = 0,2984$; $p\text{-valor} = 0,0334$).

Quanto ao modo e tempo de estocagem LHR, a análise das amostras do LHOC no grupo Global mostrou uma relação fraca entre a AD e VC ($r = 0,4287$; $p\text{-valor} < 0,0001$). No grupo Termo esta relação foi moderada e significativa ($r = 0,5255$; $p\text{-valor} = 0,0001$). Nas amostras do grupo Prematuro, a relação entre a AD e VC do LHOC também foi fraca e significativa ($r = 0,4263$, $p\text{-valor} = 0,0018$).

Quanto ao modo e tempo de estocagem LHC, a análise das amostras do LHOC no grupo Global mostrou que existe uma relação fraca entre a variação da AD e VC ($r = 0,4357$; $p\text{-valor} < 0,0001$). Esta relação é mais forte no LHC quando comparado ao LHF ($r = 0,2886$) do mesmo grupo. No grupo Termo, a relação entre a AD e VC do LH também mostrou-se fraca ($r = 0,4595$; $p = 0,0009$) semelhante ao resultado no grupo Prematuro ($r = 0,4396$; $p\text{-valor} = 0,0012$).

5 DISCUSSÃO

Na Unidade de Neonatologia internam RNPT e RNT pelas mais diversas causas. Quando estas crianças estão impossibilitadas de sugar no seio materno, o LH pode ser ordenhado e oferecido ao RN via sonda ou copo. O cuidado no manejo com o LHOC que lhes é administrado deve ser rigoroso para manter a qualidade do leite, procedimento este que não pode ser considerado um procedimento casual/aleatório, mas sim o resultado de um trabalho racional, competente tecnicamente e direcionado por protocolos de fluxo, desde a coleta até o momento do consumo. Deve-se considerar em todo processo que os receptores são crianças frágeis fisiologicamente e com imunidade imatura, não competentes para a prevenção de complicações, se expostas a riscos.

Diversos estudos sobre avaliação da qualidade do LHOC e pasteurizado, doado aos BLH estão disponíveis na literatura. Entretanto ainda existe carência de pesquisas que analisem os efeitos de diferentes tempos e modos de estocagem sobre AD e VC do LHOC e a relação entre ambos, valendo-se de amostras de leite ordenhado cru exclusivo de mães com RN internados em Unidade de Neonatologia.

Assim, esta pesquisa analisou o efeito dos diferentes modos e tempos de estocagem sobre a AD e VC do LHOC. Para tanto, buscaram-se doadoras de LH por livre demanda ao BLH do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

5.1 CARACTERÍSTICAS DAS DOADORAS DAS AMOSTRAS

A idade das mães com RN internados na Unidade de Neonatologia, que vieram ao BLH e doaram amostras de LH no período de coleta dos dados, apresentou média de 28 (DP=5) anos (16 a 43 anos).

Quanto à IG entre as doadoras que tiveram parto prematuro, observou-se média de 33,0 (DP=3,1) semanas (24 a 36) e, para as de parto a termo, média de 38,1 (DP=1,3) semanas (37 a 41). O número das doadoras das amostras quanto ao tipo de parto, termo e prematuro, foi semelhante, 49 % e 51% respectivamente. As mães de prematuros foram as que frequentaram mais precocemente o BLH com

média de 4,9 (DP=1,8), mediana de quatro dias pós-parto (dia da coleta da amostra), em relação às mães de parto a termo que foi de 7,2 (DP=5,2) e mediana de seis dias, provavelmente devido às orientações recebidas pela equipe do BLH diante da necessidade mais urgente de apoio e ajuda prática que as mães de RNPT apresentam. O número de mães de parto a termo que vieram ao BLH com RN internados na Neonatologia, pode ser explicado por ser o HC-UFPR referência para alto risco. Das gestantes de alto risco encaminhadas para este hospital, muitas conseguem manter a gravidez até o termo, mas os RN necessitam de cuidados especiais, por apresentarem problemas relacionados aos agravos durante a gestação, como as causadas por diabetes, hipertensão arterial, problemas cardíacos, renais, mal formações entre outros, e internam na Unidade de Neonatologia-UTIN do Hospital de Clínicas. Desta unidade, as mães são encaminhadas para o BLH do mesmo hospital.

Quanto ao tempo de lactação, a maior frequência de doação de amostras de LH ocorreu até o quinto dia pós parto (71%), o que pode ser explicado pela rotina de manutenção da internação das mães para acompanhamento do RN na Unidade de Neonatologia. No HC-UFPR, as puérperas são estimuladas a permanecerem próximas ao RN, recebem apoio das equipes para o AM e para frequentarem o BLH. Este período também refletiu a busca ativa pela equipe do BLH na enfermaria, em especial, do Alojamento Conjunto e do setor de Ginecologia, setores onde as puérperas permanecem após o parto neste hospital. Portanto, o menor número de doação das amostras ocorrida a partir 6.º dia de lactação deve-se à alta hospitalar, momento no qual também espera-se que as mães estejam oferecendo o LM ao RN, seja por sonda, copo ou amamentação direta e, assim, diminuem as visitas ao BLH.

As doadoras que continuaram vindo ao BLH após este período de seis dias, o fizeram por alguns motivos como pela doação espontânea de LH, manutenção da lactação ou por dificuldades com manejo. Houve também doadoras que relataram não ter estimulado as mamas durante a internação e, na proximidade da alta do RN foram solicitadas a amamentar, tiveram dificuldades ou baixa produção láctea, levando-as a procurar por ajuda.

As amostras de LH coletadas na primeira semana pós parto até o sétimo dia somaram 79%. Observou-se que, destas, 30% eram de mães de RNT e 49% mães de RNPT; 13% total ocorreram do oitavo ao 14.º dia, sendo 11% de mães de RNT e 2% de mães de RNPT; e 8% do total ocorreram do 15.º ao 17.º dia de lactação,

sendo todas mães de RNT. Portanto, a procura das mães pelo BLH e todas amostras analisadas nesta pesquisa foram coletadas entre a primeira, segunda e terceira semanas pós-parto.

Oregan *et al.* (2002), em um estudo comparativo do LH de mulheres com parto a termo e prematuro, demonstraram que não há diferença significativa na produção do volume de leite nos primeiros cinco dias pós-parto. Os autores mediram a concentração de prolactina no leite e observaram que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os dois grupos, com a concentração média para as mulheres pré-termo, sendo $54,1\pm14,2$ mg/L e para as mulheres de termo $60,6\pm17,2$ mg/L. Segundo Valdés *et al.* (1996), quanto maior a frequência das mamadas, maior será o estímulo das terminações nervosas da mama, mantendo assim os níveis de prolactina plasmáticos elevados e aumentando também a síntese de leite.

Para outros autores, a produção láctea está na dependência da frequência e da duração da estimulação manual, ou por bombas ou por sucção das mamas, mas também na dependência do estado físico, emocional e psicológico da puérpera (ZAVASCHI; KUHENBECKER, 1991; KING, 1998; FEWTRELL *et al.*, 2001).

5.2 O EFEITO DOS DIFERENTES MODOS E TEMPOS DE ESTOCAGEM SOBRE A ACIDEZ NAS AMOSTRAS DE LHOC

Segundo o Manual da ANVISA, 2008, os valores de acidez *Dornic* para o LHF, imediatamente após a ordenha, se encontram entre 1 e 4°D e quanto menos alteração sofrer, melhor será a liberação do cálcio e fósforo do LH para o metabolismo do RNPT. Para Luzeau; Barrois e Odièvre (1983) estes valores estão entre 3 a 6°D.

Nesta pesquisa, observou-se 93% das amostras de LHF com valores de AD inferiores a 4°D e 7% de 4 a 4,4°D. Almeida (1986) em estudo realizado também com amostras de LHOC (LHF) de 19 nutrízes, observou variação da AD de 3,5 a 10,5°D ($5,6 \pm 1,0^{\circ}\text{D}$) considerados valores normais, uma vez que foram analisadas imediatamente após a ordenha. A variação nos valores de AD obtida nas amostras das doadoras da presente pesquisa, no LHF explica-se pela influência de componentes do próprio LH, que podem variar de mulher para mulher, entre eles citam-se os sais minerais, os citratos, fosfatos e proteínas (ALMEIDA, 1998; GALHARDO; ARAUJO;

BORG, 2002). A variação de AD também pode ocorrer devida a atividade mais intensa da lipoproteína lipase que ocorre no LH das mulheres com produção abundante, como as doadoras que possuem leite excedente às necessidades de seu filho (LUZEAU; BARROIS; ODIÉVRE, 1983; GALHARDO; ARAUJO; BORG, 2002).

Outros estudos conduzidos na análise de acidez, utilizando a mesma técnica descrita nesta pesquisa, a titulação de *Dornic*, tem encontrado ampla variação de valores para AD no LHOC doado a BLH, porém a maioria deles utilizaram amostras de LH de doadoras externas, coletado em domicílio e analisado após a estocagem sob congelamento. Entre eles, o estudo de Almeida e Dórea (2006) analisou 909 amostras de 195 doadoras de leite humano, em um BLH em Brasília e encontrou 99,2% com valores de AD inferiores a 8^oD, variando de 2 a 8^oD e média de 4,8±1,4^oD. Cavalcante *et al.* (2005) analisaram 4.211 amostras de LH doado a um BLH no Ceará, e encontraram 63,8% com valores de AD inferiores a 4^oD e 7,1% com valores acima de 8^oD. Moraes, Oliveira e Dalmas (2013), na análise de 30.846 amostras de LH coletado de várias localidades da região de Londrina e doados ao BLH do Hospital Universitário daquela cidade, encontraram 19% com AD de 1 a 4^oD; 80% de 4^o a 8^oD e 1% descartados por AD acima desta faixa.

Novak e Cordeiro (2007) analisaram 200 amostras de LH coletadas em domicílio e doadas ao BLH referência Nacional no Rio de Janeiro, e encontraram 96% com AD igual ou inferior a 8^oD. Destaca-se, portanto, que os estudos supracitados diferiram deste estudo, principalmente nas condições em que a coleta do LH foi realizada. No presente estudo, a coleta ocorreu em sala interna do BLH sob supervisão e acompanhamento. Difere, também, quanto aos resultados obtidos, com a predominância de valores inferiores na AD (93% <4^oD), podendo-se inferir a importância do ambiente adequado, que não favoreça o crescimento da microbiota produtora de ácido láctico e o aumento dos valores de AD no LH, como também a importância do preparo da mulher que vai extrair seu leite para doação, principalmente para a administração na forma fresca, cru ao próprio filho prematuro.

Na presente pesquisa, realizada no BHC-HC-UFPR, foram seguidas normas técnicas do manejo adequado e rigoroso para evitar contaminação microbiana, antes, durante e após a coleta. Observou-se que, tanto sob refrigeração por 12 horas(LHR),como sob congelamento por 15 dias (LHC),nenhuma amostra apresentou valor igual ou acima de 8^oD. Destaca-se que houve 100% do leite aprovado para uso seguro, conforme a literatura e em acordo com a legislação vigente pela ANVISA

(2008) que recomenda o uso de LH somente quando a acidez apresentar valores até 8ºD. O LH com valores de AD acima deste, apresenta risco de ter suas características alteradas, como: desestabilização de proteínas solúveis e micelas de caseína, redução do teor de creme, da gordura total, do valor calórico, promoção da coagulação do LH, alteração do odor, redução dos fatores de proteção, potencial risco de estar contaminado com bactérias e pode levar à acidose ou alcalose metabólica e enterocolite necrozante (ALMEIDA; NOVAK; SANDOVAL, 1998).

Rona *et al.* (2008) também relataram a importância do ambiente para coleta de LH, analisaram o efeito do tempo e temperatura de estocagem de 37 amostras de LHOC, em três condições de estocagem: grupo 1 em tempo zero e imediatamente congeladas; grupo 2 em amostras que permaneceram quatro horas à temperatura ambiente (25°C a 28°C) e após foram congeladas; grupo 3 de amostras que permaneceram 24 horas sob refrigeração (6°C a 8°C), seguidas de congelamento. Os autores revelaram grande variação da AD entre as amostras do grupo quatro horas e do grupo 24 horas, com coeficiente de variação inferior a 50%, o que não aconteceu no grupo zero (LHF) imediatamente congeladas, com coeficiente de variação de 27% e os valores de AD apresentaram-se entre 1 e 4,3ºD semelhante a presente pesquisa. Os autores atribuíram como causa para a grande variação da AD no grupo 2 e 3, o crescimento de diferentes microrganismos psicotróficos (crescem em temperaturas <7°C) fermentadores da lactose. Concluíram que há necessidade de congelar o LHOC imediatamente após a sua ordenha.

Os resultados da baixa AD do LHOC nos três modos e tempos de estocagem obtidos nesta pesquisa, podem ser explicados principalmente pelo rigoroso manejo nas coletas das amostras, no qual foram usados recursos recomendados para evitar ações que elevam rapidamente a acidez do LHOC, como os cuidados rigorosos de higiene pessoal, a utilização de materiais estéreis, o rápido e adequado processo de estocagem, resfriamento e congelamento do LH também observados por outros autores (COVAS *et al.*, 2000; HECK; FERREIRA, 2000; GALHARDO; ARAUJO; BORG, 2002; HECK, 2002; SERAFINI *et al.*, 2003; CAVALCANTE *et al.*, 2005; NOVAK; CORDEIRO, 2007; ANVISA, 2008; MATTAR; QUINTAL, 2008; APRILE; FEFERBAUM, 2011; ROMAN *et al.*, 2013).

Segundo o Guia da Academia Americana de Pediatria para o cuidado perinatal, o LH mantém suas características bacteriostáticas, se conservado em temperatura entre 19 e 26°C até seis horas ou até 48 horas em refrigeração (AAP, 2002). A temperatura

constitui fator extrínseco de grande importância que influi na velocidade das atividades bioquímica e microbiana dos microrganismos, sendo as condições mais frias e estáveis as de maior segurança na ação preventiva para a preservação da qualidade do LHOC (ALMEIDA; NOVAK, 2001; APRILE; FEFERBAUM, 2011).

Em pesquisa anterior, realizada por Grazziotin, Grazziotin e Letti (2010) junto às doadoras que coletaram LH em domicílio em 2006, 24% das amostras doadas ao BLH, foram descartadas devido à AD acima de 8ºD e revelou como causas relacionadas: falha nos cuidados com higiene das mãos, a não proteção do nariz e boca, a demora no congelamento do leite após a ordenha, problemas técnicos com freezer, abertura muito frequente do refrigerador, congelador ou freezer, o armazenamento do LHOC junto a outros alimentos e o uso de esgotadeiras com inadequado preparo. Após a aplicação de um *Chek-list* para orientação das doadoras em domicílio, no ano de 2008 o descarte do LH diminuiu para 10,5%. Destaca-se que na presente pesquisa, todas doadoras coletaram as amostras de LH na sala específica para manejo e seguiram com rigor todos os passos para a realização da ordenha do LH.

Silva e Oliveira (2010) compararam a AD entre amostras de leite ordenhado em BLH e de leite em domicílio. Para as 33 amostras de LH ordenhado na sala de coleta de um BLH, 81,8% apresentou valores inferiores a 4ºD e 18,2% entre 4 e 8ºD. Para as 963 amostras de LH ordenhado em domicílio, 67,3% com AD inferior a 4ºD, 31,2% entre 4 e 8ºD e 1,6% acima de 8ºD. Estes resultados reforçam a importância de um ambiente adequado, reservado e a supervisão no manejo com o LHOC.

No LHF, momento zero, a média de AD para foi $2,8 \pm 0,9$ D, mediana de 2,5, com intervalo de confiança (IC) de 95% [2,62; 2,98]. Após a refrigeração por 12 horas e o congelamento por 15 dias, as médias e medianas variaram e apresentaram-se semelhantes no LHR e LHC ($3,1 \pm 0,9$ D) e (3,1ºD) respectivamente e IC [2,98; 3,28] para ambos modos e tempos de estocagem. Salienta-se que o maior valor de AD foi de 5,6ºD no LHR. Roman *et al.* (2013) qualificaram com LH de qualidade superior o que apresenta AD inferior a 4ºD e, de qualidade intermediária, o LH com AD de 4 a 7ºD, mais próximo do valor original e indica seguramente menos alterações na sua composição, melhor aproveitamento do cálcio e fósforo e além de menor risco de presença de micro-organismos. Segundo Borgo (2011), Aprile e Feferbaum (2011) a refrigeração e o congelamento são processos que não eliminam micro-organismos

patogênicos, mas têm a capacidade de inibir o seu crescimento, bem como de inibir a velocidade das reações químicas e enzimáticas do LH.

De acordo com Scarso *et al.* (2006), a AD elevada do LH coletado em domicílio, é responsável por cerca de 20% das amostras de leite rejeitadas pelos BLH, mesmo nas amostras que são entregues em recipientes esterilizados e fornecidos pelas próprias Unidades. Galhardo, Araujo e Borgo (2002) também afirmam que a AD elevada não ocorre somente devido às más condições higiênico-sanitárias, mas também porque o LHOc submetido à refrigeração e ao congelamento, pode sofrer transformações químicas na sua fração lipídica, e os valores expressos de AD não ocorrem somente devido à degradação da lactose pela ação de micro-organismos (ALMEIDA; COSTA; NOVAK, 2002; VIEIRA *et al.*, 2004; CAVALCANTE *et al.*, 2005). Segundo Borgo (2011) e Chang, Chen e Lin (2012) pode haver aderência da gordura do LHOc às paredes dos frascos no processo de congelamento e descongelamento, e a formação de cristais de gelo maiores e pontiagudos, durante o recongelamento, perfuram o glóbulo de gordura liberando os ácidos graxos, o que pode alterar tanto a AD como o VC. Segundo manual ANVISA (2008), a diminuição da temperatura do LH deve ser a mais rápida possível e a sua estabilidade mantida pelo equipamento utilizado, pois a velocidade aplicada exerce influência sobre a qualidade do LHO.

Para Luzeau, Barrois e Odièvre (1983), a presença de ácidos graxos livres pode elevar o valor da AD, mas esta ocorrência é mais comum no LHOc, que permanece mantido à temperatura ambiente. Os autores concluíram que, mesmo na ausência da taxa anormal de ácido láctico, pode ocorrer lipólise do LH *in vitro*. Lucas *et al.* (1978); Wang *et al.* (1999); Jensen (1999); Koletzko *et al.* (2001); Tinoco (2001); Lira (2002) afirmam que a estocagem rápida do LH sob congelamento não altera significativamente a qualidade da fração lipídica do LH cru, uma vez que as baixas temperaturas são ideais para retardar as reações enzimáticas e químicas, como a oxidação dos lipídios, o que implica na alteração da AD como também no VC.

Segundo Cavalcante *et al.* (2005), outra explicação para uma das causas da elevação da acidez, pode ser a temperatura interna elevada das caixas térmicas durante o transporte do LHOc, que favorece a proliferação e ação de bactérias patogênicas e de suas respectivas enzimas. Devido a isso, ocorre a hidrólise dos triacilgliceróis pelas lipases que produzem ácidos graxos não esterificados (ácidos graxos livres), os quais elevam a concentração de íons H⁺ do LH, reduzindo o pH e aumentando a acidez. Segundo estes autores, mantendo a temperatura do LHOc

entre 4 e 8°C por até 30 horas, há uma inibição da multiplicação de bactérias patogênicas mesofílicas (crescem melhor em 15 a 40°C) e as atividades das lipases seriam apenas reduzidas.

Na presente pesquisa, as amostras de LHOC foram mantidas sob congelamento por 15 dias em temperaturas que variaram de -18°C a -26°C, e não houve necessidade de transporte, pois foram estocadas no próprio BLH, em sala anexa à da coleta das amostras. Covas *et al.* (2000) examinaram amostras de LHOC após o congelamento a -20°C por 15 dias, e observaram que a estabilidade química manteve-se semelhante às amostras do leite fresco. Quando o LHOC foi mantido sob refrigeração a 4°C por quatro dias, os autores evidenciaram alterações lipolíticas e proteolíticas liberando os ácidos graxos e aminoácidos livres, o que levou à alteração da AD.

Sousa e Silva (2010), em análise de 20 amostras de LH coletadas em um BLH de referência, encontraram uma média de $2,83 \pm 2,36^{\circ}\text{D}$ para AD no LHF e média de $7,91 \pm 3,93^{\circ}\text{D}$, nas mesmas amostras após o congelamento. Este resultado foi semelhante à média observada nesta pesquisa para o LHF ($2,8 \pm 0,9^{\circ}\text{D}$), porém muito diferente quando comparadas às amostras de LHC na presente pesquisa, que foi de $3,1 \pm 0,9^{\circ}\text{D}$. Os autores explicaram que a alteração ocorreu provavelmente devido a temperautra que, segundo Cavalcante *et al.* (2005), atua como modificador da acidez titulável, podendo variar de 8 a 13°D ou mais (LUZEAU;BARRÓIS; ODIÉVRE 1983).

Barroso (2010) correlacionou a AD com contaminação microbiológica e observou que, das 2.368 amostras de LH coletadas em domicílio e doadas a um BLH, 9,76% das suas amostras apresentaram AD acima de 8°D após o congelamento, e das amostras aprovadas, 44,4% apresentaram AD de 1 a 4°D, 45,5% de 5 a 7°D e 8,9% igual a 8°D. Ao submeter à análise microbiológica, a autora observou presença de coliformes totais em 29,1%, 59,37% e 11,46% nas amostras com AD de 1 a 4°D, 5 a 7°D e 8°D respectivamente. Concluiu que a qualidade do LH está intimamente relacionada com o grau de contaminação inicial, falta de cuidados higiênicos-sanitários e com o binômio tempo/temperatura que o LH permanece desde a sua ordenha até o processamento. Tanaka *et al.* (2010), em estudo com 2.990 amostras doadas ao BLH, encontraram 17,86% com valores de AD igual ou acima de 8°D, após o congelamento, porém 96,82% estavam livres de contaminação, enquanto que apenas 3,18% apresentavam algum tipo de contaminação ou micro-organismo. Para os autores, a AD elevada está vinculada a outros fatores e não somente à contaminação microbiana, e que se deve considerar as formas de estocagem do LH.

Silva (2008), em análises de LHOC também após congelamento, encontrou como resultados no primeiro mês, 42% do volume recebido AD entre 4 a 5ºD e 22% com acidez igual ou superior a 8ºD. No segundo mês, 26% dos leites apresentaram 4ºD, nenhuma amostra inferior a 2ºD e 20% com igual ou superior a 8ºD. No terceiro mês, 21% com acidez de 4ºD, 45% entre 5 e 7ºD, e 22% descartados com AD igual ou superior a 8ºD. Em outro BLH, a mesma autora analisou 40 amostras de LHOC e observou 3% das amostras com AD 2ºD, 24% com 4ºD, 50% entre 5 e 6ºD e 18% com 7ºD. A autora não informou o tempo de estocagem.

Sobre todos estes estudos citados com amostras de LH coletadas em domicílio, sem supervisão e transportados ao BLH, pode-se afirmar que é uma situação que não oferece a mesma segurança obtida, quando as coletas são realizadas em ambiente próprio e com supervisão. Para esta pesquisa, como recomendado no BLH do HC-UFPR, as doadoras seguiram o *check list* sobre o passo a passo da técnica de coleta (GRAZZIOTIN; GRAZZIOTIN; LETTI, 2010). Também Bortolozo, Tiboni e Candido (2004) sugeriram a aplicação de um sistema de qualidade e segurança nos BLH, através do uso de um Manual para Ordenha, visto que os riscos de contaminação neste ato estão presente e a higiene da mama e das mãos é fator relevante para isso, assim como a imediata e adequada estocagem do LHOC. Todos estes cuidados foram seguidos rigorosamente para as amostras analisadas nesta pesquisa durante a coleta e estocagem, o que pode explicar os valores de AD no LHR e LHC.

Quanto à amplitude e variação nos valores da AD original, observadas nas amostras do LHF entre as doadoras, os resultados reforçam as conclusões de estudos supracitados, sobre as diferenças individuais da própria natureza da mulher. E a variação destes valores de AD após a refrigeração por 12 horas e após congelamento por 15 dias, embora tenha sido estatisticamente significativa conforme Tabela 3, em termos biológicos manteve todos valores (1,3 a 5,6ºD) muito próximos aos valores da acidez original (1 a 4ºD) do LHF e bastante inferiores ao limite para descarte (8ºD), sendo considerados adequados ao consumo. E em termos práticos, estes resultados estão segundo as Normas da ANVISA (2008) e da rBLH-BR possibilitando que o LH seja administrado aos RN na Neonatologia de forma segura.

5.3 O EFEITO DOS DIFERENTES MODOS E TEMPOS DE ESTOCAGEM SOBRE O VALOR CALÓRICO DO LHOC

O LH é um fluido com composição dinâmica (ALMEIDA, 1999a; MATTAR; QUINTAL, 2008), e os lipídios são os componentes mais variáveis, representando o substrato que fornece a principal fração de energia do LH. O índice calórico do LH ocorre conforme esta variação, independente do teor de proteínas e carboidratos (LUCAS *et al.*, 1978; GROSS; GELLER; TOMARELLI, 1981; ALMEIDA, 1999a; JENSEN, 1999; WANG *et al.*, 1999; KOLETZKO *et al.*, 2001; SCHANLER, 2001; LIRA, 2002; MATTAR; QUINTAL, 2008). Na literatura não há um consenso para os limites que classificam o LH como hipocalórico ou normocalórico. Para alguns autores, o LH em caloria por 100mL (Kcal/100mL de LH) é considerado hipocalórico quando apresenta valor menor que 50,00 (MATTAR; QUINTAL, 2008); para outros, quando abaixo de 58,0 (MORAES; OLIVEIRA; DALMAS, 2013). Já para o LH hipercalórico encontram-se citações com limite para valores iguais ou superiores a 70,0 ou a partir de 71Kcal/100mL de LH (APRILE, 2006; MORAES; MATTAR; QUINTAL, 2008; MORAES; OLIVEIRA; DALMAS, 2010; PANICHI *et al.*, 2010; OLIVEIRA; DALMAS, 2013).

Nesta pesquisa, para os valores calóricos em Kcal por 100 mL, no LHF encontrou-se 63% das amostras de LH com VC inferior a 59,0 e 14% das amostras com VC igual ou superior a 70,0. Após o congelamento, encontrou-se 65% das amostras com VC inferior a 59,0 e 10% igual ou superior a 70,0. Moraes *et al.* (2013) em um estudo com 30.846 amostras após congelamento no BLH de Londrina entre 2006 e 2009, definiram como hipocalórico o LH com valores inferiores a 58 Kcal/100ml e encontraram 53,5% das amostras nesta faixa. Como hipercalórico os autores classificaram os valores acima de 71Kcal/100mL, representando 8,3% das amostras. Aprile (2006), de um total de 15.283 amostras de LH analisadas após o congelamento, encontrou 9% com VC acima de 70 Kcal/100mL. As amostras foram coletadas de doadoras com períodos de lactação muito variados, diferentes das doadoras das amostras da presente pesquisa (parto prematuro e de termo até a segunda semana pós parto), que mostrou 10% das amostras de leite hipercalórico também após o congelamento.

Na presente pesquisa, o VC no LHF apresentou uma variação com amplitude de 39,0 a 124,1Kcal/100mL e média de $56,5 \pm 15,8$ Kcal/100mL. Weber *et al.* (2001)

analisaram amostras de LH de 20 mães de RNPT com muito baixo peso, quatro vezes ao dia, nas quatro primeiras semanas de lactação. Também encontraram grande variação e amplitude no VC das amostras de leite da mesma mãe e entre as 20 mães. Vieira *et al.* (2004) encontraram amplitude de 42,0 a 122,4 Kcal/100mL entre as 61 amostras de LHOC coletado após 14.^o dia de lactação (leite maduro). Esta amplitude é explicada na citação de Costa e Sabarense (2010, p. 450): "a modulação lipídica do LH não se dá por efeitos isolados, mas por diversos fatores intrínsecos e extrínsecos à nutriz, que agem de forma concomitante e dificultam a avaliação de tal modulação".

A modulação lipídica está diretamente ligada ao VC do LH, sofre influência do período do dia em que o leite é ordenhado, do volume de leite retirado da mama, se antes ou após a mamada, do estágio da lactação (leite prematuro, colostro, transição e maduro), e da idade gestacional (MARIN *et al.*, 2009). Autores citados a seguir, apontam que existem diferenças no VC do leite de uma mesma mulher dentro das 24 horas do dia, entre as mulheres de forma geral e também durante a mesma mamada, dependendo do volume retirado e tempo de duração desta, e do tempo de ordenha do LH, principalmente devido à variação dos lipídios. São citadas ainda a individualidade genética, nutrição materna, estilo de vida e grupos étnicos como tendo efeitos sobre o VC do LH apontados por pesquisadores em vários países do mundo (GROSS; GELLER; TOMARELLI., 1981; VALDÉS; SÁNCHEZ; LABBOCK, 1996; ALMEIDA, 1999a; JENSEN, 1999; MAYANS; MARTELLI, 1999; PICCIANO, 2001; BIANCUZZO, 2003; OLIVEIRA, 2003; EUCLYDES, 2005; YAMAWAKY *et al.*, 2005; HEIMAN; SCHANLER, 2006; TINOCO *et al.*, 2007; SEVERINE *et al.*, 2008; COSTA; SABARENSE, 2010; MOURA, 2010; KOCISZEWSKA-NAJMAN *et al.*, 2012).

A amplitude e a variação no VC observadas nesta pesquisa, podem ser explicadas também porque 51% das amostras foram de leite prematuro, de diferentes IG (24 a 36), e 49% de leite a termo (37 a 41 IG) e diferentes fases de maturidade (prematuro, colostro, leite de transição e leite maduro) (Tabela 1 e 2). Menconi (2010) refere valores calóricos em caloria por 100 mL de LH, estimados conforme seu estágio de lactação: para o colostro, média de 30,0, leite de transição de 50,0 a 60,0 e o LH maduro de 70,0 Kcal/100mL. Segundo Lamounier, Vieira e Gouvea (2002), o conteúdo calórico do colostro oscila em torno de 58 Kcal/100 mL e no leite maduro em torno de 71 Kcal/100 mL. Conforme o tempo de ordenha da mama: o leite anterior com média de 46,4 a 70,0 Kcal/100mL e leite posterior de 72,0 a 110,0 Kcal/100mL aproximadamente.

Comparando-se com os valores calóricos desta pesquisa, para o grupo total das 100 amostras a média foi de $56,5 \pm 15,8 \text{ Kcal/100ml}$; para as amostras de leite do grupo Termo foi de $58,3 \pm 14,8$ e para amostras de leite do grupo Prematuro, $54,8 \pm 16,6 \text{ Kcal/100mL}$.

Murase *et al.* (2009) estudaram o VC de amostras de LH retirado de diferentes lóbulos da mesma mama, e mostraram que há diferenças entre o VC e a concentração de proteínas. Concluíram que a síntese do LH difere em cada um dos lóbulos da mesma mama e o VC varia dentro da mesma mama, conforme a região, de um lóbulo a outro, além das fases de leite anterior, intermediário e posterior. Estes fatores não foram considerados na presente pesquisa, pois não houve distinção entre mama direita ou esquerda para extração das amostras do LH.

Os valores calóricos encontrados nesta pesquisa podem ter sido influenciados pelo fato de que as amostras foram coletadas no período da manhã, com horários variando entre 08 e 12:30 horas e sempre os primeiros 30 ml de LH, descartando-se apenas algumas gotas de leite ou primeiros jatos, conforme as normas da rBLH-BR para manutenção da qualidade do LH ordenhado. Segundo Gross, Geller e Tomarelli (1981), em estudo comparativo entre o LH de mãe de RNPT e LH de mãe de RNT, a concentração total de proteínas diminuiu dentro das primeiras quatro semanas pós parto prematuro, enquanto a gordura aumentou em ambos os grupos. Os autores concluíram que a composição proteico-calórica modifica-se de acordo com o tempo de lactação. Anderson *et al.* (1981) e Lucas e Hudson (1984) encontraram concentração de gordura e proteínas mais altas no leite das primeiras semanas das mães com parto prematuro, porém o teor de gordura tornou-se semelhante ao leite de parto a termo até a quarta semana de lactação. Kociszewska-najman *et al.* (2012) não observaram diferenças significativas no VC entre as 22 amostras de LH de mães de RNPT e as 39 amostras de LH de mães de RNT ($p > 0,05$). E segundo autores a seguir, o LH na fase de colostro apresenta conteúdo lipídico menor quando comparado ao leite posterior da mama, ao leite de transição e ao leite maduro (GROSS; GELLER; TOMARELLI, 1981; AKRÉ, 1997; KING, 1998; ALMEIDA, 1999a; FEFERBAUM; QUINTAL; ARAUJO, 2003; EUCLYDES, 2005; SILVA, 2008; ALMEIDA, 2010).

Vieira *et al.* (2004), em análise de 61 amostras de LH coletadas após 14 dias de lactação (leite maduro) e 10 minutos após o início da mamada, ou após 10 minutos de ordenha por expressão manual, apresentaram amplitude no VC de 42,0 a 122,4 Kcal/100mL e média de $85,9 \pm 27,9 \text{ Kcal/100mL}$, mais elevada em comparação

aos resultados da presente pesquisa. Embora os autores não tenham informado qual volume de leite retirado nos 10 minutos que precederam a coleta da amostra, esta média elevada no VC pode ser explicada pelo tempo esperado para a coleta da amostra, pois lactantes com 14 dias após o parto de termo tendem a apresentar maiores volumes de leite, mais facilidade na sua extração, o percentual de gordura aumenta com o tempo de ordenha, e o leite maduro apresenta maior VC em comparação ao colostro (GROSS; GELLER; TOMARELLI, 1981; ALMEIDA, 1999a; VINAGRE, 2001; VIEIRA *et al.*, 2011).

Meier *et al.* (2002), em análise de 32 amostras de LH (7 anterior, 12 posterior e 13 composto) de mães de prematuros, observaram VC com média de 59,5 Kcal/100mL e amplitude entre 47,7 e 74,7 Kcal/100mL nas amostras de leite anterior. Os estudos acima citados diferiram da presente pesquisa, quanto ao número de amostras analisadas (100) em diferentes IG e diferentes fases de lactação, o que pode explicar a maior amplitude (39,9 e 124,1 Kcal/100mL). Entretanto, observou-se VC aproximado na média com o estudo de Meyer, corroborando com a literatura sobre a variação da composição calórica do LH, como uma característica individual e própria da espécie (SILVA, 2004; YAMAWAKI *et al.*, 2005; HEIMAN; SCHANLER, 2006; TINOCO *et al.*, 2007; SEVERINE *et al.*, 2008; COSTA; SABARENSE, 2010; MOURA, 2010; KOCISZEWSKA-NAJMAN *et al.*, 2012).

A rBLH-BR recomenda e utiliza o LH independente do seu valor calórico. Os leites hipercalóricos são os mais adequados para os RNPT com necessidade de ganho rápido de peso. O leite anterior, geralmente com baixa caloria, segundo Silva (2004), pode ser administrado para recém-nascidos e crianças maiores para fornecer-lhes os fatores imunológicos, sobretudo, porque se destaca pela proteção química e biológica exercida no trato digestivo do lactente e fortalecem contra doenças, sendo designados para crianças com dietas específicas.

A amplitude do VC manteve-se semelhante nos três modos e tempos de estocagem, apesar da diferença encontrada no limite máximo para o LHF (124,1 Kcal/100mL) ser mais elevada que no LHR e no LHC, de 116,6 e 116,1 Kcal/100mL, respectivamente (Tabela 1). A diferença nas médias de VC entre o LHF (56,5 Kcal/100mL), o LHR (55,8 Kcal/100mL) e o LHC (55,9 Kcal/100mL) não foi estatisticamente significativa. Atribui-se este fato à adequada homogeneização das amostras de LH feita antes do re-embalagem, e à leitura cuidadosa das medidas para o cálculo do crematócrito, uma vez que existe o risco de aderência da gordura nas

paredes dos recipientes nos quais o LH é estocado (MAYANS; MARTELLI, 1999; WEBER *et al.*, 2001; VIEIRA *et al.*, 2004; BORGIO, 2011; CHANG; CHEN; LIN, 2012). Assim, a manipulação adequada das amostras e dos procedimentos minimizou a ocorrência de aderência, levando aos resultados obtidos.

Os estudos de Lucas *et al.* (1978); Wang *et al.* (1999); Jensen (1999); Almeida (1999a); Koletzko *et al.* (2001); Lira (2002); Aprile e Feferbaum (2011) com relação ao VC do LH, ressaltam também a importância da estocagem rápida do LH em refrigeração e ao congelamento, para que não ocorra alteração na qualidade da fração lipídica do LHOC..

Lopes, Amâncio e Juliano (1992) observaram 20,42% de perda de lipídio entre o LHF e o LHC, e concluíram que manter o LH sob refrigeração ou congelamento em equipamentos que são frequentemente abertos, provocam alteração na temperatura interna e levam ao descongelamento e recongelamento. Isto afeta a conservação do LH, influencia a sua estrutura físico-química por desestabilizar a fração emulsão e leva à quebra da membrana do glóbulo de gordura, libera a lipase e reduz o teor de lipídios com aumento da acidez (LUZEAU; BARROIS; ODIÉVRE, 1983; ALMEIDA, 1999a; WANG *et al.*, 1999; DEWEY, 2001; LIRA, 2002; CAVALCANTE *et al.*, 2005; TINOCO *et al.*, 2007; BORGIO, 2011). Estes fenômenos diferentes não foram analisados na presente pesquisa, mas é provável que não tenham ocorrido com as amostras, devido ao rigoroso cuidado com o freezer e o refrigerador, de uso exclusivo, e abertura das portas exclusivamente para manejo das amostras e ligados à rede com gerador próprio.

Stancari *et al.* (2012) analisaram o VC de 3.681 amostras de LH de BLH após congelamento, e encontraram 94,8% de valores calóricos entre 50 e 70 Kcal/mL e 5,2% acima deste. Moraes, Oliveira e Dalmas (2013) analisaram 30.846 amostras de LH de BLH após a pasteurização, e encontraram 55,3% de LH classificado como hipocalórico (<58Kcal/100mL) e 8,3% de LH hipercalórico ($\geq 71,1$ Kcal/100mL). Almeida e Dórea (2006), em estudo com 909 amostras de LH de 195 doadoras (15 a 45 anos de idade) de um BLH, separaram as amostras de LH pelo tempo de lactação. Encontraram médias de 53,7 Kcal/100mL no colostro, de 52,1Kcal/100mL no leite de transição e de 52,9 \pm 85 kcal/mL no leite maduro. Estes estudos não mencionaram LH de mães com RNPT. A presente pesquisa revelou percentagem mais elevada de LH hipercalórico e média de VC mais elevada (56,5Kcal/100mL) para as 100 amostras considerando que foram constituídas por LH em tempos variados de IG e lactação.

Estudos incluindo outros componentes do LH, submetidos a alguma forma de estocagem, como o de Berkow *et al.* (1984), que analisaram a atividade da lipase e o efeito do congelamento/descongelamento rápido do LH, seguido de estocagem por um mês a -20°C e -70°C, concluíram que estes processos não afetaram a atividade desta enzima, essencial para o adequado aproveitamento das gorduras do LH. Hamosh *et al.* (1997) estocaram amostras de LH durante 1 hora e durante 24 horas, nas temperaturas de 15°C, 25°C e 38°C, e analisaram a estabilidade da amilase e sal biliar dependente de lipase no LH. Os autores observaram que as duas enzimas permaneceram estáveis nas temperaturas de 15°C e 25°C por 24 horas, mas sob 38°C, a lipase sofreu redução de 15% e a amilase de 20%. Os autores concluíram que o LH mantém a mesma atividade enzimática após a estocagem a curto prazo, semelhante a do leite fresco oferecido ao bebê.

Garza *et al.* (1982) também em estudo dos efeitos da estocagem e das temperaturas sobre LHOc concluíram que, idealmente, o LHF deve ser utilizado dentro de 4 horas após a coleta, ou deve ser congelado imediatamente para minimizar as alterações trazidas pela possível oxidação.

Bertino *et al.* (2013), em estudo dos efeitos do resfriamento prolongado no perfil lipídico sobre a atividade da lipase, e o estado oxidativo do LHOc de mãe de prematuro, estocado sob refrigeração e analisado após 03, 24, 48, 72 e 96 horas da coleta, observaram que há a preservação do estado geral da atividade das enzimas oxidativas e lipolíticas. Concluíram que a refrigeração nestes tempos não afetou a composição dos ácidos graxos. Segundo estes autores, os bebês alimentados com leite refrigerado até 96 horas, recebem igual fonte de ácidos graxos e lipases ativas como se estivessem mamando diretamente o leite de sua mãe. Por outro lado, Wang *et al.* (1999) concluíram que o LH sofre alteração no seu valor calórico quando submetido ao congelamento e descongelamento, com a diminuição do crematócrito mas que os efeitos destes processos não se mostraram significativos sobre o conteúdo dos lipídios, proteínas e carboidratos, fato reforçado na presente pesquisa, na qual o VC não apresentou alteração significativa em qualquer modo e tempo de estocagem,

Já para Lawrence (1999), Edmond e Barth (2006), a estocagem do LH para uso posterior pela criança, causa algum efeito sobre seus componentes, decorrentes do tipo de recipiente, aquecimento, resfriamento e congelamento do LH. Segundo Lawrence (1999) o leite pode ser refrigerado até por 72 horas com pouca alteração.

Quanto ao congelamento, Lawrence (1999) afirma que destrói a atividade celular e reduz as vitaminas B6 e C, mas não altera proteínas e lipídios.

Ainda sobre efeitos de diferentes modos e tempos de estocagem, Silprasert *et al.* (1987) observaram que os valores calóricos do LH diminuíram significativamente nas amostras mantidas em temperatura ambiente por 45 minutos e a 37°C por 30 minutos. Porém, quando as amostras de LH foram mantidas por 14 dias a 4°C e por 28 dias a -20°C, os valores calóricos mantiveram-se estáveis. Os autores concluíram que precauções rigorosas devem ser tomadas no manejo e estocagem do LH.

5.4 O EFEITO DOS MODOS E TEMPOS DE ESTOCAGEM SOBRE ACIDEZ E VALOR CALÓRICO NAS MOSTRAS DE LH SEPARADAS CONFORME O TEMPO DE LACTAÇÃO: A TERMO E PREMATURO

Na análise das médias de AD do LHF entre os grupos Global (100 % das amostras), Termo (49%) e Prematuro (51%), observou-se que as amostras do leite do grupo Termo apresentaram diferença estatisticamente significativa (p-valor 0,0030), sendo a média de AD original (LHF) menor ($2,6 \pm 0,8$) em comparação à média de AD do grupo Prematuro ($3,0 \pm 0,8$). Cavalcante *et al.* (2005) referem que o pH do LH ordenhado encontra-se entre 5,47 e 7,84, e varia diretamente com o tempo de lactação e indiretamente com o percentual lipídico. Segundo os autores, seria coerente afirmar que, quanto maior a concentração de gordura total, maior seria a possibilidade do LH desenvolver acidez mais elevada e corroboram com Luzeau, Barróis e Odièvre (1983), os quais concluíram que, quanto maior é o conteúdo de lipídios, maior é o valor da acidez do LH.

Nesta pesquisa, das 51 amostras de leite do grupo Prematuro no LHF, 98% foram coletadas entre dois e sete dias, ou seja, primeira semana pós-parto, e 2% de oito a 14 dias de lactação, na segunda semana pós parto prematuro. Observou-se que os resultados do VC nas amostras do LH do grupo Prematuro apresentaram menor média do valor calórico ($54,8 \pm 16,6$ Kcal/100mL) e maior média do valor de AD, ao ser comparado com as 49 amostras do leite do grupo Termo, que apresentaram VC de $58,3 \pm 14,8$, e menor valor de AD. Esta análise apresentou

diferença não significativa estatisticamente (p-valor 0,101) entre os VC entre os grupos (Tabela 5).

Para Gross, Geller e Tomarelli (1981); Barros *et al.* (1984); Hamosh (1996); Vinagre (2001); Marin *et al.* (2009) e Almeida (2010), o leite de mães de parto prematuro, nas duas primeiras semanas pós-parto contém mais proteínas, maior conteúdo calórico que o leite de termo e, até a quarta semana, se assemelha ao colostro do leite de mães com RNT. Anderson *et al.* (1981) e Lucas e Hudson (1984) encontraram concentração de gordura e proteínas mais altas no leite das primeiras semanas das mães com parto prematuro, porém o teor de gordura tornou-se semelhante ao leite de parto a termo até a quarta semana de lactação. Kociszewska-najman *et al.* (2012) não observaram diferenças significativas no VC entre as 22 amostras de LH de mães de RNPT e as 39 amostras de LH de mães de RNT ($p>0,05$).

Abranches *et al.* (2014) analisaram 34 amostras de LHF de doadoras de BLH, também de parto a termo, e mesmo período da manhã desta pesquisa, embora não consideraram o tempo de lactação, encontraram média no VC de $56,6\pm 11,76$ Kcal/100mL, valores semelhante a presente pesquisa.

Kociszewska-Najman *et al.* (2012) estudaram amostras de LH de 22 mães com parto pré-termo e 39 de parto a termo. As amostras foram coletadas no período da manhã e à noite, nas fases de colostro, transição e maduro e analisaram a composição do LH entre os grupos. Observaram menor valor de crematócrito nas amostras de leite prematuro coletadas pela manhã (média de $66,3\pm 45,6$ Kcal/100mL) e o maior valor no leite das mães de parto a termo, coletadas à noite (média de $91,9\pm 70,9$ Kcal/100mL). Os autores acima citados concluíram que o LH de mães de RNPT diferiram do LH de mães de RNT, porém sem diferença significativa e, que o crematócrito mostrou as diferenças diárias que ocorrem no LH de acordo com a literatura. Segundo Akre (1997) e Almeida (1999a), a variabilidade do LH é funcional e a sua complexidade biológica evidencia que seus componentes existem adaptados às características fisiológicas do metabolismo do lactente, com ação específica e destaque para a biodisponibilidade dos constituintes do LH, em adequação às necessidades da criança e com as situações maternas.

Lawrence e Lawrence (2005) analisaram amostras de LH prematuro e encontraram média de 48,7Kcal/100mL no colostro, de 51,9 Kcal/100 mL na fase de transição e 53,4Kcal/100 mL na fase de leite maduro. Meier *et al.* (2002) analisaram o VC de 7 amostras de leite anterior de mães de prematuros e encontraram média

de 60,9 Kcal/100mL, diferentemente do presente estudo, no qual foram coletadas 51 amostras em diversas IG. Lin *et al.* (2011) analisaram 98 amostras de LH obtidas após duas semanas pós-parto prematuro, de 14 mães com média de IG de 29 semanas (27 a 36). As amostras de LH foram coletadas por 7 dias consecutivos e foi observada uma média do VC de 67 Kcal/100mL.

Segundo Lucas *et al.* (1978), Koletzko *et al.* (2001), Innis (2003) e Jensen e Lapillonne (2009), os lipídios do LH determinam o VC e são constituídos por 98% de triacilgliceróis. Entre seus componentes essenciais estão os ácidos graxos saturados e poli-insaturados. Minda *et al.* (2004), com relação ao leite de mães com RNT, demonstraram que a composição dos ácidos graxos essenciais sofrem alteração durante a lactação, com quantidades mais elevadas e significativamente nas duas primeiras semanas pós-parto a termo, em especial os ácidos graxos essenciais, como o ômega 3, alfa-linoleico, mas não compararam o conteúdo destes componentes com o leite de mães com RNPT no mesmo período. Marin *et al.* (2009) concluíram que a idade gestacional influi na composição dos ácidos graxos essenciais, os ácidos graxos saturados, fonte altamente calórica, de forma a atender às necessidades do RNPT e se apresentam em maior quantidade no LH de mães destas crianças, quando comparados ao LH de mães de RNT.

Mahan e Scott-Stamp (1994) também afirmam que os ácidos graxos saturados e poli-insaturados são altamente calóricos. Estes autores concordam com Gross *et al.* (1980), Anderson *et al.* (1981) e Lucas e Hudson (1984), ao concluírem que o leite de mães de RNPT apresenta VC mais elevado nas primeiras duas semanas, tanto no pós-parto prematuro como também o leite de mães com parto a termo, porém, ainda mais elevado no leite das mães com RNPT, em comparação às de RNT no mesmo período. Entretanto, na presente pesquisa, os resultados do VC no LHF, mostraram média mais elevada nas amostras do leite das mães de RNT ($58,3 \pm 14,8$ Kcal/100mL) do que no leite das mães de RNPT ($54,8 \pm 16,6$) com p-valor = 0,1015, embora não estatisticamente significativa.

Com relação às amostras de LH de mães com parto a termo, (30% de 2 a 7 dias pós-parto a termo, 13% de 8 a 14 dias e 8% do 15º ao 17º dia pós parto) analisadas nesta pesquisa, observou-se que apresentaram VC de acordo com a literatura. Diversos autores afirmam que o VC do LH no parto a termo tende a aumentar com o passar do tempo, à medida que o leite passa da fase de colostro à de transição até a fase de maduro, devido ao aumento gradativo do teor de gordura,

que se estabiliza algumas semanas após (COLLARES; GONÇALVES; FERREIRA, 1997; KOLETZKO *et al.*, 2001; VINAGRE; DINIZ, 2002; MORGANO *et al.*, 2005; KOCISZEWSKA-NAJMAN *et al.*, 2012).

Estudos de análise com outros componentes do LH como os de Luzeau; Barois e Odièvre (1983); Lopes; Amâncio e Juliano (1992); Borgo (2011); Bertino *et al.* (2013) observaram que a refrigeração e o congelamento levam à diminuição dos fatores antioxidantes, responsáveis pela conservação natural do LH. Os autores concluíram que esta diminuição pode causar alteração no pH, lipólise, elevação da acidez do LH e alteração do VC.

Miranda *et al.* (2004) avaliaram mudanças nas propriedades de dois fatores antioxidantes do LH, a glutathione peroxidase e atividade na concentração do marcador do estresse oxidativo de 32 amostras de LHOC. As amostras foram divididas em três alíquotas, a primeira analisada imediatamente, a segunda refrigerada a 4°C e analisadas 24 horas depois; a terceira congelada a -20°C e analisada depois de 10 dias. Observaram que a atividade antioxidante diminuiu significativamente no LH refrigerado e no congelado, quando comparado com as suas amostras controle e o marcador de estresse oxidativo aumentou apenas no leite refrigerado mas não no congelado. Observaram que as perdas nas propriedades antioxidantes do LH aumentaram com o tempo de estocagem e diferiram na intensidade de acordo com a temperatura. Os autores concluíram que o congelamento foi mais eficaz na conservação destas propriedades do LH do que a refrigeração.

Silvestre *et al.* (2010) analisaram as mesmas propriedades antioxidantes do LH após congelamento em diferentes temperaturas (-20°C e -80°C) e tempos (15, 30, 60 dias). Os autores concluíram que o congelamento induz perdas nas propriedades antioxidantes do LH, que essas perdas aumentam com a duração do tempo de estocagem e diferem na intensidade de acordo com a temperatura. Segundo Tijerina-Sáenz *et al.* (2009), estas perdas podem afetar a qualidade físico-química do LH levando ao ranço oxidativo.

Na presente pesquisa, para os resultados obtidos entre as amostras de leite separadas pelo tempo de parto, Termo e Prematuro, e no grupo Global não houve diferença na média dos VC nem para os valores de AD entre a refrigeração e o congelamento. Tanto a refrigeração por 12 horas como o congelamento por 15 dias apresentaram efeitos semelhantes sobre o valor de acidez e do VC do LHOC. Segundo Almeida e Novak (2001) “a temperatura constitui fator extrínseco de grande

importância que influencia na velocidade das atividades bioquímica e microbiana dos microrganismos, sendo as condições mais frias e estáveis as de maior segurança”.

Com relação ao VC, não foi observada diferença significativa em qualquer análise entre os três tempos e modos de estocagem, nem entre os grupos Termo e prematuro, apesar da média do VC ter se apresentado maior no grupo Termo (Tabela 4 e 5).

5.5 ANÁLISE DA CORRELAÇÃO ENTRE OS VALORES DE ACIDEZ E VALOR CALÓRICO DO LH NOS TRÊS MODOS E TEMPOS DE ESTOCAGEM

Na presente pesquisa, para o LHF o valor da média de AD foi de $2,8 \pm 0,9$ e da média do VC foi de $56,5 \pm 15,8 \text{ Kcal}/100\text{mL}$. Após a refrigeração por 12 horas (LHR) a média de AD apresentou elevação para $3,1 \pm 0,9$ e a média do VC, diminuição para $55,8 \pm 14,1$. Após o congelamento por 15 dias (LHC), a média de AD também apresentou aumento para $3,1 \pm 0,9$ e o VC diminuição para $55,9 \pm 14,2$. Na análise de correlação entre a AD e o VC (Tabela 6) observou-se que houve aumento no valor das médias de AD e diminuição nas médias do VC, a partir do LHF para as amostras no LHR e LHC, com resultados semelhantes entres estes dois últimos modos e tempos de estocagem. Embora a correlação apresentou-se significativa estatisticamente, mostrou ser fraca para todos as amostras no grupo Global, como também após a análise dos grupos em separado, Termo e prematuro e nos diferentes modos e tempos de estocagem (Tabela 6).

Pelos resultados observados na análise das 100 amostras de LH desta pesquisa, não foi possível afirmar que a variação da AD levou à variação do VC.

Em comparação ao estudo de Rona *et al.* (2008), que correlacionaram a AD com vários componentes do LH, observaram também fraca correlação entre as variáveis acidez e a proteína do LH, em três condições diferentes de estocagem, bem como entre acidez e cálcio ($p > 0,05$). Ainda no estudo de Rona *et al.* (2008) quanto à acidez, houve diferença significativa nos valores das amostras de LH entre os três modos de estocagem, mas quanto à gordura (que define o VC do LH) houve diferença significativa dos seus valores somente entre o tempo zero e 24 horas refrigerado. Os autores concluíram que a alteração da AD não teve influência

significativa sobre a concentração de nutrientes, semelhante ao resultado desta pesquisa, no qual a variação da acidez não mostrou influência significativa sobre a variação do VC.

Cavalcante *et al.* (2005) selecionaram 66 amostras de LHOC em um BLH com AD superior a 7^oD, que foram descongeladas e analisadas (teste 1) quanto ao teor de creme, gordura total e valor calórico, e recongeladas por 15 dias e novamente analisadas (teste 2). Foi observada redução com diferença significativa dos valores de creme, gordura total e valor calórico entre os dois testes, sendo que a média do VC diminuiu de 71,6 Kcal/100ml no teste 1 para 66,6 Kcal/100ml no teste 2. Os autores explicaram o fenômeno como resultado da influência da AD elevada (>7^oD) à possível lipólise nas amostras de LH, diferentemente desta pesquisa, na qual todas amostras apresentaram grau de AD $\leq 5,6^{\circ}\text{D}$ (média 3,1 no LHR e LHC).

Para as amostras do LHF no grupo Global, a AD apresentou a média de $2,8 \pm 0,9$ e VC de $56,5 \pm 15,8$; no grupo Termo, a AD apresentou o menor valor de acidez dos três grupos ($2,6 \pm 0,8$), entretanto o VC foi o mais elevado ($58,3 \pm 14,8$) dos três grupos; já no grupo Prematuro, a média de AD foi a mais elevada dos três grupos ($3,0 \pm 0,8$), no entanto, apresentou o menor VC ($54,8 \pm 16,6$) dos grupos. O fato se repetiu na correlação observada nos dois outros tempos e modos de estocagem (LHR e LHC). Luzeau, Barrois e Odièvre (1983), concluiriam que a AD do LH é mais sensível ao conteúdo total de solutos e pode estar diretamente relacionada ao conteúdo calórico. Nesta pesquisa não foi observada a mesma tendência dos resultados de Luzeau, Barrois e Odièvre (1983).

Ericson, Gill e Chan (2013), em 100 amostras de LH de mães de RNPT, e média de pH de $6,5 \pm 0,1$ (amostras controle), dividiram as amostras e acidificaram experimentalmente para $4,5 \pm 0,1$. Após congelamento a 4°C, observaram que nas amostras acidificadas experimentalmente, houve diminuição de 56% na atividade da lipase, de 14% na proteína total, mas aumento de 36% no valor do crematócrito (VC). Concluíram que há influência da alteração da AD sobre componentes do LH, porém, quanto ao achado destes autores sobre o aumento do VC relacionado ao aumento da AD, os dados obtidos na presente pesquisa não observaram o mesmo resultado..

6 CONCLUSÃO

Os diferentes modos e tempos de estocagem, aos quais as amostras de LHOC de mães com RN internados na Unidade de Neonatologia foram submetidas, mostraram ter influência no grau de AD com variação significativa estatisticamente a partir do LHF, quando comparado ao LHR e LHC, mas não houve diferença estatisticamente significativa entre estes dois últimos.

Para os VC das mesmas amostras, não foram observadas diferenças significativas em qualquer tempo ou modo de estocagem, e nem em qualquer dos três grupos analisados, global, termo e prematuro.

Quanto à variação encontrada após a refrigeração por 12 horas, e o congelamento por 15 dias, observou-se que todos valores de AD se mantiveram próximos aos valores originais do LHF.

Nesta pesquisa, a variação entre a AD e o VC apresentou correlação fraca e estatisticamente significativa nos três modos e tempos de estocagem, LHF, LHR e LHC, tanto no grupo global das amostras, como para o grupo Termo e Prematuro. As amostras do leite do grupo Prematuro apresentou média de AD mais elevada e média do VC menor, em comparação às amostras do grupo Termo.

Os valores de AD encontrados em todas as amostras de LH, nos três tempos e modos de estocagem se mantiveram dentro dos limites aprovados pela Norma da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, que regulamenta o funcionamento, a prevenção e controle de riscos em Banco de Leite Humano (ANVISA, 2008).

7 CONSIDERAÇÕES DO AUTOR

O conhecimento de que o LH é o alimento ideal para todos recém-nascidos a termo e prematuros está consolidado na literatura. Entretanto, para os prematuros, há necessidade de avaliação individualizada e cuidados nutricionais especiais e diferenciados. A questão atual é a defesa pelo uso do leite materno exclusivo, cru, homólogo, ordenhado quando for impossível a amamentação direta.

O número de 100 amostras de LH analisadas na presente pesquisa, pode ser considerado relevante e o resultado obtido é viável como apoio científico seguro, bem como base para informação e apoio na estratégia para nutrição dos RNPT, e aos RN de risco, para otimização do uso do LHOC exclusivo de mãe ao filho. Esta estratégia precisa ser promovida, defendida, apoiada e protegida

O leite materno pode ser garantido em tempo integral aos RN mesmo na ausência diária da mãe, nos horários prescritos para alimentação, nos quais ela não possa estar junto no momento para retirar seu leite fresco. Toda Unidade de Terapia intensiva Neonatal deveria manter um espaço exclusivo, próximo ou anexo ao serviço, onde as mães possam realizar o manejo com seu leite, receber orientação, apoio e supervisão durante o procedimento, desde a higienização até o final da ordenha, da forma semelhante à realizada nesta pesquisa, que mostrou a possibilidade de se obter um leite da própria mãe com qualidade e segurança para o RNPT e RN de risco.

Diante das dificuldades para as mães coletarem seu leite, os profissionais de saúde precisam de capacitação, de conhecimento e desenvolver habilidades para o acolhimento e ajuda prática nos cuidados às mães com todas crianças recém-nascidas. Nos Hospitais onde não há BLH, os profissionais de saúde podem ser capacitados para realizar as técnicas de análise da acidez e do crematócrito e a utilizarem estes métodos que são simples, baratos e práticos, para identificar a qualidade do LH das mães e oferecer o melhor e mais adequado, de forma exclusiva a sua criança.

Pela literatura também está consolidado o conhecimento de que o LH apresenta variação calórica durante as 24 horas do dia, conforme o volume que é retirado da mama, porém, o manejo pode ser ajustado para se obter o leite posterior, quando da necessidade de um LH mais calórico para os RN que têm restrição de volume ou para aqueles que apresentam ganho muito lento de peso. Identificar as

amostras com menor valor de AD e associar ao VC mais elevado, também pode ser uma forma de otimizar a nutrição destas crianças.

Uma prática viável é estimular as mães a ordenhar o leite por tempo mais prolongado, a fim de obter um volume maior e fazer a separação em frascos distintos, à medida que o leite vai sendo retirado, ou seja: primeiro frasco, o LH anterior; segundo frasco, o LH do meio, rico em cálcio e fósforo; e terceiro frasco, o LH posterior, mais rico em gordura, o que é comprovado pela literatura. Utilizar a estratégia que avalia o VC do leite materno ordenhado cru, antes de oferecê-lo ao RNPT, o que pode ser aplicado tanto na gestão dos aditivos, como também para seleção do LM mais calórico, e garantir ingesta mais adequada às necessidades diárias, contribui com a diminuição do uso indiscriminado do leite artificial e à manutenção do AM.

É importante que a assistência praticada nas Unidades de Neonatologia, leve em consideração o valor de ações menos complexas, mais acessíveis, disponíveis e seguras e incluam cada vez mais a participação da mãe no cuidado perinatal, proporcionando uma atenção humanizada, individualizada. Para viabilizar uma destas ações, é justamente alimentar o filho com seu leite, o que torna a mãe uma participante efetiva nos cuidados e na recuperação. Os profissionais da área da saúde precisam estar preparados para integrar o manejo clínico-hospitalar da lactação à rotina das Unidades de Neonatologia (NASCIMENTO; ISSLER, 2003; 2004).

O LME deve ser a base nutricional e o alimento preferido, mesmo que alternado com fórmulas ou aditivos para atender à necessidade dos prematuros extremos. Além dos benefícios do LME à saúde a longo prazo, também do ato de amamentar, ainda antes da alta hospitalar, produz efeitos significantes no vínculo mãe/filho. Melhor qualidade de vida a todas as crianças, das mais pobres até aquelas com nível social mais elevado, prematuras ou a termo.

Importante salientar que o resultados das amostras de LHOC do grupo prematuro, quanto à relação entre a AD e o VC, a média de AD apresentou-se mais elevada e a média do VC apresentou-se menor, quando comparado ao grupo Termo, embora a diferença não estatisticamente significativa. Sendo o grau de AD importante para o metabolismo e absorção de nutrientes do LH, particularmente pelo RNPT, e o VC essencial para o ganho de peso tão necessário, mais pesquisas precisam ser realizadas para comprovação e elucidação deste resultado observado na presente pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ABRANCHES, A. D.; SOARES, F. V. M.; JUNIOR, S. C. G.; MOREIRA, M. E. L. Freezing and thawing effects on fat, protein, and lactose levels of human natural milk administered by gavage and continuous infusion. **Jornal de Pediatria** (Rio de Janeiro), v.90, n.4, p.384-388, 2014.
- ACADEMY OF BREASTFEEDING MEDICINE (ABM). Protocolo n.º 16: Amamentado al bebé hipotónico. **Breastfeeding Medicine**, v.2, n.2, 2007.
- _____. Protocolo n.º 08: Human Milk Storage Information for Home Use for Full-Term Infants. **Breastfeeding Medicine**, v.5, n.3, p.127-130, 2010.
- AGARWAL, S.; KARMAUS, W.; DAVIS, S.; GANGUR, V. Review: Imunne markus in breast milk and fetal and maternal body fluids: a systematic review of perinatal concentration. **Journal of human Lactation**, v.27, n.2, p.172-186, 2011.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Banco de leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos**. Brasília: ANVISA, 2008. 156p.
- _____. **Norma Regulamentadora 32: Guia trabalhista**. Disponível em: <www.guiatrabalhista.com.br/legislacao/nr/nr32.htm>. Acesso em: 16 maio 2013.
- AKRÉ, J. **Alimentação infantil: bases fisiológicas**. 2.ed. São Paulo: Instituto de Saúde/IBFAN, 1997.
- ALENCAR, S. M. S. A política nacional de aleitamento materno. In: ISSLER, H. **O aleitamento materno no contexto atual: políticas, práticas e bases científicas**. São Paulo: Sarvier, 2008. p.70-101.
- ALMEIDA, H. Situações especiais do lactente. In: CARVALHO, M. R.; TAVARES, L. A. M. **Amamentação, bases científicas**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. p.221-239.
- ALMEIDA, H.; VENANCIO, S. I.; SANCHES, M. T.; ONUKI, D. The impact of kangaroo care on exclusive breastfeeding in low birth weight newborns. **Jornal de Pediatria** (Rio de Janeiro), v.86, n.3, p.250-253, 2010.

ALMEIDA, J. A. G. **Implantação de um banco de leite humano de referência**. Projeto do Instituto Fernandes Figueira da Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 1985.

_____. **Qualidade do leite humano coletado e processado em bancos de leite**. 84p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Microbiologia Agrícola. Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, 1986.

_____. **Amamentação: repensando o paradigma**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1998.

_____. Saúde com solidariedade. Rede brasileira de bancos de leite humano expande atuação e é referência mundial. **Revista de Manguinhos**, Rio de Janeiro, n.26, p.23-29, 2013.

_____. **Amamentação: um híbrido natureza-cultura**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1999a.

_____. Variação do teor de gordura ao longo da mamada. In: **Processamento e controle de qualidade do leite humano ordenhado**. Brasília: Ministério da Saúde, 1999b.

ALMEIDA, J. A. G.; COSTA, M. L.; NOVAK, F. R. Homoginizador de leite humano ordenhado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BLH, 3. 2002, Petrópolis. **Anais...** Petrópolis, RJ, 2002.

ALMEIDA, J. A. G.; GOMES, R.; NOVAK, F. R. Amamentação: um híbrido natureza-cultura. **Jornal de Pediatria**, v.80, n.5, p.11-25, 2004.

ALMEIDA, J. A. G.; GUIMARÃES, V.; MAIA, P. R.; ALENCAR S. M.; ISHY A. Y.; MATTAR, M. J. Os bancos de leite humano no Brasil. In: ISSLER, H. **O aleitamento materno no contexto atual: políticas, práticas e bases científicas**. São Paulo: Sarvier, 2008. p.163-170.

ALMEIDA, J. A. G.; GUIMARÃES, V.; NOVAK, F. R. **Normas técnicas para bancos de leite humano: seleção e classificação do leite humano ordenhado cru**. Rede Nacional de BLH, Fiocruz, 2005. Disponível em: <www.redeblh.fiocruz.br>. Acesso em: 27 jun. 2013.

ALMEIDA, J. A. G.; NOVAK, F. R.; ALMEIDA, C. H. G.; CHAVES, R. M. M.; ARAUJO, F. M. S.; GARRIDO, J. R. P. **Recomendações técnicas para o funcionamento de bancos de leite humano**. 2.ed. Brasília: Ministério da Saúde, 1998. 56p.

ALMEIDA, J. A. G.; NOVAK, F. R.; SANDOVAL, M. H. Recomendaciones técnicas para los bancos de leche humana II: control de calidad. **Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría**, v.61, n.1, p.12-15, 1998.

ALMEIDA, J. A. G.; NOVAK, F. R. **O papel dos bancos de leite humano no incentivo ao aleitamento materno**. São Paulo: Atheneu, 2001.

ALMEIDA, S. G.; DOREA, J. G. Quality control of banked Milk in Brasilia, Brazil. **Journal of Human Lactation**, v.22, n.3, p.335-339, 2006.

ALVES, A. M. L.; SILVA, E. H. A. A.; OLIVEIRA, A. C. Desmame precoce em prematuros participantes do método mãe canguru. **Revista da Sociedade Brasileira de Fonoaudiologia**, v.12, n.1, p.23-28, 2007.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS (AAP). Breastfeeding and the use of human milk. Policy Statement. Section on Breastfeeding. **Pediatrics**. v.129, n. 3, p. 827-841, 2012.

_____. Breastfeeding and the use of human milk. **Pediatrics**, v.115, n.2, p.496-506, 2005.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS (AAP); AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS. **Guidelines for perinatal care**. 5th ed. New York: CV Mosby, 2002.

ANCHIETA, M. L.; XAVIER, C. C.; COLOSIMO, E. A. Velocidade de crescimento de recém-nascidos pré-termo adequados para idade gestacional. **Jornal de Pediatria** (Rio de Janeiro), v.80, n.5, p.417-424, 2004.

ANDERSON, G. H. Human milk feeding. **Pediatric Clinics of North America**, v.32, n.2, p.335-353, 1985.

ANDERSON, G. H.; ATKINSON, S. A.; BRAYAN, M. H. Energy and macronutrient content of human milk during early lactation from mother giving birth prematurely and a term. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.34, n.2, p.258-261, 1981.

ANDERSON, N. K.; BEEMAN, K. A.; McGUIRE, M. A.; DASGUPTA, N.; GRINARI, J. M.; WILLIAMS, J.; McGUIRE, M. K.; Dietary fat type influences total milk fat content in lean women. **Journal of Nutrition**, v.135, n.3, p.416-421, 2005.

ANDERSON, Y.; SAVMAN, K.; BLACKBERG, L.; HERNELL, O. Pasteurization of mother's own milk reduces fat absorption and growth in preterm infants. **Acta Paediatrica**, v.96, n.10, p.1445-1449, 2007.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Banco de Leite Humano**: funcionamento, prevenção e controle de riscos. Brasília: ANVISA, 2008. 156p.

APRILE, M. M. **Crescimento de recém-nascidos de muito baixo peso alimentados com leite de banco de leite humano selecionado segundo valor calórico e protéico**. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo (SP), 2006.

APRILE, M. M.; FEFERBAUM, R.; ANDREASSA, N.; LEONE, C. Growth of very birth weight infants fed with Milk from a human Milk bank selected according to the caloric and protein value. **Clinics**, v. 65, n. 8, p. 751-756, 2010.

APRILE, M. M.; FEFERBAUM, R. Banco de leite humano e prematuridade. In: _____. **Banco de leite humano**. São Paulo: Atheneu, 2011. p.91-104.

AQUINO, R. R.; OSÓRIO, M. M. Alimentação do recém-nascido pré-termo: métodos alternativos de transição da gavagem para o peito materno (revisão). **Revista Brasileira de Saúde Materna e infantil**, v.8, n.1, p.11-16, 2008.

ARCURI, E. F.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; PINTO, S. M.; ANGELO, F. F.; SOUZA, G.N. Qualidade microbiológica do leite nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p.440-446, 2006.

ARSLANOGLU, S.; MORO, G.E.; ZIEGLER, E.E. Optimization of human milk fortification for preterm infants: new concepts and recommendations. **J. Perinatology Medicine**. v.38, p.233-288, 2010.

ASSIS NETO, A. C.; GOMES, M. M. G.; PEREIRA, T. G.; SANTOS, M. C. M. Perfil microbiológico do leite materno do Banco de leite da Maternidade Evangelina Rosa, Terezina (Piauí). **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.1, n.19, p.75-84, jan./jun. 2002.

BACHRACH, V. R; SCHWARZ, E.; BACHRACH, L. R. Breastfeeding and the risk of hospitalization for respiratory disease in infancy: a meta-analysis. **Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine**, v.157, n.3, p.237-243, 2003.

BARBOSA, V. L. **Conhecimentos e opiniões de enfermeiras sobre a participação da mãe na assistência ao RN prematuro**. Dissertação (Mestrado) - Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1990.

BARROS, M. D.; YAMASHIRO, E.; BARRET, O.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. Características do leite de mãe de recém-nascidos de baixo peso. **Pediatria**, São Paulo, v.6, n.2, p.53-57, 1984 (revisão).

BARROSO, O. L. G. Avaliação comparativa de acidez e análise microbiológica em leite humano ordenhado em um banco de leite humano em Fortaleza, Ceará. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BANCOS DE LEITE HUMANO, 5.; CONGRESSO IBEROAMERICANO DE BANCOS DE LEITE HUMANO, 1.; FÓRUM DE COOPERAÇÃO INTERNACIONAL EM BANCOS DE LEITE HUMANO - ABC/Fiocruz, 2010. Brasília. **Anais...** Brasília/DF, 28-30 set. 2010. Disponível em: <<http://www.redeblh.fiocruz.br/media/trconblh10.pdf>>. Acesso em: 14 jul. 2014.

BECKER, M.; FIORI, R. M. Fatores maternos associados ao lactócrito de leite humano. **Pediatria**, São Paulo. v.5, p.371-375, 1983.

BENKOL, K.; LELEIKO, N. S. A rational approach to infants formulas. **Pediatric Annals**, v.16, n.3, p.225-230, 1987.

BERKOW, S. E.; FREED, L. M.; HAMOSH, M.; BITMAN, J.; WOOD, D. L.; HAPP, B.; HAMOSH, P. Lipases and lipids in human milk: Effect of freeze-thawing and storage. **Pediatric Research**, v.18, n.12, p.1257-1262, 1984.

BERTINO, E.; GIRIBLADI, M.; BARO, C.; GIANCOTTI, V.; PAZZI, M.; PEILA, C.; TONETTO, P.; ARSLANOGLU, S.; MORO, G.E.; CAVALLARIN, L.; GASTALDI, G. Effect of prolonged refrigeration on the lipid profile, lipase activity, and oxidative status of human milk. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.56, n.4, p.390-396, 2013.

BIANCUZZO, M. **Breastfeeding the Newborn**: Clinical strategies for nurses. 2 nd. Saint Louis: Mosby, 2003.

BIRCH, D. G.; BIRCH, E. E.; HOFFMAN, D. R.; UAUY, R. D. Retinal development in very-lowbirth-weight infants fed diets differing in omega-3 fatty acids. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.33, n.8, p.2365-2376, 1992.

BISQUERA, J. A.; COOPER, T. R.; BERSETH, C. L. Impact of necrotizing enterocolitis on length of stay and hospital charges in very low birth weight infants. **Pediatrics**, v.109, n.3, p.423-428, 2002.

BOO, N. Y.; NORDIAH, A. J.; ALFIZAH, H.; NOR-ROHAINI, A. H.; LIM, V. K. Contamination of breast milk obtained by manual expression and breast pumps in mothers of very low birthweight infants. **Journal of Hospital Infection**, v.49, n.4, p.274-281, 2001.

BORGIO, L. A. **Efeitos da pasteurização e do congelamento sobre a fração lipídica do leite humano**. 125p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências da Saúde, UNB, Brasília, 2011.

BORGIO, L. A.; RAMOS, K. L.; ALMEIDA, S.G.; SEIDE, L. O.; OLIVEIRA, L. A.; ARAUJO, W. M. C. Avaliação do funcionamento e identificação de pontos críticos de controle em bancos de leite humano do Distrito Federal. **Higiene Alimentar**, v.19, n.129, p.43-46, 2005.

BORTOLOZO, E. A. F. Q; TIBONI, E. B; CANDIDO, L. M. B. Leite humano processado em bancos de leite para o recém-nascido de baixo peso: análise nutricional e proposta de um novo complemento. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v.3, n.16, p.199-205, set. 2004.

BOYD, C. A.; QUIGLEY, M. A.; BROCKLEHURST, P. Donor breast milk versus infant formula for preterm infants: Systematic review and meta-analysis. **Archives of Disease in Childhood – Fetal and Neonatal Edition**. v. 92, p.169-175, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n.º 306 de 07 de dezembro de 2004. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. **DOU**, Brasília, DF, 10 dez. 2004.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC n.º 171, de 04 de setembro de 2006. Dispõe sobre Regulamento Técnico para funcionamento de Bancos de Leite Humano. **DOU**, Brasília, DF, 06 set. 2006.

_____. Agência Nacional de vigilância Sanitária - ANVISA. **Banco de leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos**. Brasília: Anvisa, 2008.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de políticas de Saúde. Área de Saúde da Criança. **Atenção Humanizada ao recém-nascido de baixo peso: método canguru: manual do curso**. 2.ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRAZELTON, B. T. **O desenvolvimento do apego: uma família em formação**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1988.

CALIL, V. L. M. T.; FALCÃO, M. C. Composição do leite humano: o alimento ideal. **Revista de Medicina**, São Paulo, n.82, p.1-10, jan./dez. 2003a.

_____. Composição do leite humano. In: FEFERBAUM, R.; FALCÃO, M. C. **Nutrição do recém-nascido**. São Paulo: Atheneu, 2003b. p.215-227.

CALLEN, J.; PINELLI, J. A review of the literature examining the benefits and challenges, incidence and duration, and barriers to breastfeeding in preterm infants. **Advances in Neonatal Care**, v.5, n.2, p.72-88, 2005.

CAMELO J. R. J. S.; MARTINEZ, F. E. Dilemas nutricionais no pré termo extremo e repercussões na infância, adolescência e vida adulta. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v.81, (suppl 1), p.33-42, 2005.

CANADIAN PEDIATRIC SOCIETY. Nutrition Committee. Nutrient needs and feeding of premature infants. **Canadian Medical Association Journal**, n.152, p.1765-1768, 1995.

CARBONARE, S. B.; PALMEIRA, P.; SILVA, M. L. M.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. S. M. Effect of microwave radiation, pasteurization and lyophilization on the ability of human milk to inhibit *Escherichia coli* adherence to Hep-2 cells. **J. Diarrhoeal Diseases Research**, v.14, n.2, p.90-94, 1996.

CARLSON, S. E.; WERKMAN, S. H.; RHODES, P. G.; TOLLEY, E. A. Visual-acuity development in healthy preterm infants: effect of marine-oil supplementation. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.58, n.1, p.35-42, 1993.

CARVALHO, M. R. Amamentação do bebê prematuro. In: DIA, L. M. (Org.). **Amamentação Annual 2001 International**. Washington: Platiplus Media LLC, 2001. v.1. p.136-144.

_____. Amamentando seu bebê prematuro. **Aleitamento.com**, 25 abr. 2011. Disponível em: <<http://www.aleitamento.com/mae-canguru/conteudo.asp?cod=691>>. Acesso em: 21 fev. 2014.

_____. Anticorpo presente no leite materno promove saúde intestinal. **Aleitamento.com**, 10 abr. 2014. Disponível em: <<http://www.aleitamento.com/amamentacao/conteudo.asp?cod=1909>>. Acesso em: 09 jun. 2014.

CARVALHO, M. R.; TAVARES, L. A. M. **Amamentação**: bases científicas. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

CASTRO, M. P.; MOURA, M. D. R.; RUGOLO, L. M. S.; MARGOTTO, P. R. Limite de viabilidade no moderno cuidado intensivo neonatal – análise além da idade gestacional. **Com. Ciências Saúde**, 22 sup., p.101-111, 2011. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/artigos/limite_viabilidade.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2014.

CAVALCANTE, J. L. P.; TELLES, F. J. Aspectos físicos-químicos do leite humano ordenhado cru e congelado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BANCOS DE LEITE HUMANO, 3, 2002, Petrópolis. **Anais...** Petrópolis, RJ, 2002.

CAVALCANTE, J. L. P.; TELLES, F.J. S.; PEIXOTO, M. M. L. V.; RODRIGUES, R. C. B. Uso da acidez titulável no controle de qualidade do leite humano ordenhado. **Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.25, n.1, p.103-108, jan./mar. 2005.

CHANG, Y.; CHEN, C.; LIN, M. The macronutrients in human milk change of storeg in various containers. **Pediatrics and Neonatology**, v.53. p.205-209, 2012.

COLLARES, F. P.; GONÇALVES, C. V.; FERREIRA, J. S. Creamatocrit as a rapid method to estimate the contentsof total milk lipids. **Food Chemistry**, v.60, n.4, p.465-467, 1997.

COSTA, A. G. V.; SABARENSE, C. M. Modulação e composição de ácidos graxos do leite humano. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.23, n.3, p.445-457, 2010.

COVAS, M. C.; ALDA, E.; BAEZA,A.; FERRER, L.; FERNANDEZ, C. Almacenamiento de leche humana su influencia en la composicion química y desarrollo bacteriano en três momentos de La lactancia. **Archivos Argentinos de Pediatría**, v.98, n.2, p.92-98, 2000.

CRUZ, E. Recepção. In: BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Banco de leite humano, funcionamento, prevenção e controle de riscos**. Brasília: ANVISA, 2008. p.103-104.

CUNHA, J.; COSTA, T. H. M.; ITOI, M. K. Influence of maternal dietary intake and suckling on breast Milk lipid and fatty acid composition in low-incame women from Brasília. **Early Human Development**, n.81, n.3, p.303-311, 2005.

DEVINCENZI, U. M.; MATTAR, M. J. G.; CINTRA, E. M. Nutrição no primeiro ano de vida. In: SILVA, S. M. C. S.; MURA, J. D' A. P. **Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia**. São Paulo: Roca, 2007. p.319-345.

DEWEY, K. G. Nutrition, growth and complementarya feeding of the breasfed infants. **Pediatric Clinics of North America**, v.48, n.1, p.87-104, 2001.

DIJCK-BROUWER, D. A. J.; HADDERS-ALGRA, M.; BOUWSTRA, H.; DECSI, T.; BOEHM, G.; MARTINI, I. A.; BOERSMA, E. R.; MUSKIET, F. A. J. Lower fetal status of docosaheaxaenoic acid, arachidonic acid and essential fatty is associated with less favorable neonatal neurological condition. **Prostaglandins, Leukotirenes and Essential Fatty Acids**, v.72, n.1, p.21-28, 2005.

DINIZ, E. M. A.; COSTA, M. T. Z. Amamentação do recém-nascido na unidade de cuidados intensivos. In: FEFERBAUM, R.; FALCÃO, M. C. **Nutrição do recém-nascido**. São Paulo: Atheneu, 2003. p.251-255.

DONOVAN, S. M.; ODLE, J. Growth factors in Milk as mediators of infant development. **Annual Review of Nutrition**, v.14, p.147-167, 1994.

EDMOND, K.;BAHL, R. Optimal feeding of low-birth-weight infants: technical review. Geneva, **World Health Organization**, p.18, 2006. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2006/9789241595094_eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 19 jun. 2014.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Agência de informação da Embrapa, agronegócio do leite**: acidez titulável. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_194_21720039246.html>. Acesso em: 28 maio 2013.

ERICKSON, T.; GILL, G.; CHAN, G. M. The effects of acidification on human milk's cellular and nutritional content. **Journal of Perinatology**, v.33, n.5, p.371-373, 2013.

EUCLYDES, M. P. **Nutrição do lactente**: base científica para uma alimentação adequada. 3.ed. Viçosa: Suprema, 2005.

EVANS, T. J.; RYLEY, H. C.; NEALE, L. M.; DODGE, J. A.; LEWARNE, V. M. Effect of storage and heat on antimicrobial proteins in human Milk. **Archives of Disease in Childhood**, v.53, n.3, p.239-241, 1978.

FEFERBAUM, R.; QUINTAL, V. S.; ARAUJO, M. C. K. Nutrição enteral do recém-nascido de muito baixo peso. In: FEFERBAUM, R.; FALCÃO, M. C. **Nutrição do recém-nascido**. São Paulo: Atheneu, 2003. p.315-328.

FEWTRELL, M. S.; LUCAS, P.; COLLIER, S.; SINGHAL, A.; AHLUWALIA, J. S.; LUCAS, A. Randomized trial breast pump in mothers who delivered preterm infants. **Pediatrics**, v.107, n.6, p.1291-1297, 2001.

FIGUEIRA, B. B. D. Avaliação nutricional. In: COSTA, H. P. P.; MARBA S. T. **O recém-nascido de muito baixo peso**. São Paulo: Atheneu, 2004. p.203-214.

FLETCHER, M. A. The extremely-low-birthweight infant. In: AVERY, G. B.; FLETCHER, M. A.; MacDONALD, M. G. **Neonatology**: physical evaluation and classification. 4.ed. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams, & Wilkins, 1999. p.269-289.

FORD, J. E.; LAW, B. A.; MARSHALL, V. M.; REITER, B. Influence of the heat treatment of human Milk on some of its protective constituents. **Journal of Pediatrics**, v.90, n.1, p.29-35, 1977.

FORSGREN, M. Cytomegalovirus in breast Milk: reassessment of pasteurization and freeze-thawing. **Pediatric Research**, v.56, n.4, p.256-258, 2004.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ). **Programa Nacional de Controle de Qualidade em Banco de leite Humano**. Rio de Janeiro, 2003.

_____. **Leite humano ordenhado**: determinação do crematócrito. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/redeblh/seleclas.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2013.

_____. **Portal da Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano**. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/redeblh>>. Acesso em: 21 maio 2013.

GALHARDO, A. N. S. M.; ARAUJO, W. M. C.; BORGIO, L. A. Acidez Dornic como parâmetro de qualidade em bancos de leite humano. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.16, n.100, p.16-27, 2002.

GARZA, C.; JOHNSON, C. A.; HARRIST, R.; NICHOLS, B. L. Effects of methods of collection and storage on nutrients in human milk. **Early Human Development**, v.6, n.3, p.295-303, 1982.

GIANINI, N. O. Leite materno e prematuridade. In: REGO, J. D. **Aleitamento materno**. São Paulo: Atheneu, 2001. p.217-235.

GIBSON, R. A.; MAKRIDES, M. Long-chain polyunsaturated fatty acids in breast milk are they essential? **Bioactive Components of human milk**, v.511, p.375-283, 2001. Disponível em: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-1371-1_46#page-2>. Acesso em: 03 jul. 2013.

GIUGLIANI, E. R. J. Aleitamento materno na prática clínica. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v.76. (S3), p.238-252, nov. 2000.

_____. National network of human milk banks in Brazil: first class technology. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v.78, p.183-184, 2002a.

_____. Rede Nacional de Bancos de Leite Humano do Brasil: tecnologia para exportar. **Jornal de Pediatria**, Porto Alegre, v.78, n.3. p.183-184, 2002b.

GONÇALVES, A. B.; GONÇALVES, A. L.; MARTINEZ, F. E.; CAMELO J. R. J. S. Alimentação do recém-nascido pré termo. In: FEFERBAUM, R.; FALCÃO, M. C. **Nutrição do recém-nascido**. São Paulo: Atheneu, 2005.

GORGULHO, F. R.; PACHECO, S. T. A. Amamentação de prematuros em uma unidade neonatal: a vivência materna. **Escola Anna Nery**, Rio de Janeiro, v.12, n.1, p.19-24, 2008.

GOULART, A. L.; ROZOLEN, C. D. A. Nutrição enteral do recém-nascido pré termo. In: KOPELMAN, B. I.; SANTOS, A. M. N.; GOULART, A. L. **Diagnóstico e tratamento em neonatologia**. São Paulo: Atheneu, 2004. p.377-384.

GRAZZIOTIN, A. L.; GRAZZIOTIN, M. C. B.; LETTI, L. A. J. Descarte de leite humano doado a banco de Leite antes e após medidas para reduzir a quantidade de leite imprópria para consumo. **Jornal de Pediatria**, Porto Alegre, v.86, n.4, jul./ago. 2010.

GRAZZIOTIN, M. C. B. **Relatórios mensais de produtividade do banco de leite humano do Hospital de Clínicas da UFPR**, jan. 2008-jun. 2013 (arquivos). Não publicado. Disponível no Portal da REDEBLH/FIOCRUZ (www.redeblh.br).

GROSS, S. J.; GELLER, J.; TOMARELLI, R. M. Composition of breast Milk form mothers of preterm infants. **Pediatrcs**, v.68, n.4, p.490-493, 1981.

GROSS, S.J.; DAVID, R.J.; BAUMAN, L.; TOMARELI, R.M. Nutritional composition of milk produced by mothers delivering preterm. **Journal of Pediatrics**, v.96, n.4, p.641-644, 1980.

GUILHERME, J. P.; MATTAR, M. J. G.; BATISTA, T. M. C. Colostroterapia: uma proposta coerente de suplementação imunológica em recém-nascidos de muito baixo peso. In: CONGRESSO BRASILEIRO de BANCOS DE LEITE HUMANO, 5.; CONGRESSO IBERO-AMERICANO DE BANCOS DE LEITE HUMANO, 1., 2010, Brasília. **Anais...** Brasília, 2010.

GUIMARÃES, V.; NOVAK, F. R. **Normas técnicas REDEBLH-BR para bancos de leite humano**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2005.

GUTIÉRREZ, D. B.; PANCHULA, J. ABM Protocolo clínico # 8: Almacenamiento de leche humana. Información para El uso casero em bebés a término. **Medicina de La Lactância Materna**, v.5, n.3, mar. 2010.

HAMOSH, M. Breast-feeding: Unravelling the mysteries of mother's Milk. **Medscape Women's Health Journal**, v.1, n.9, p.4, 1996.

HAMOSH, M.; HENDERSON, T. R.; ELLIS, L. A.; MAO, J. I. Digestive enzymes in human milk: stability at suboptimal storage temperatures. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.24, n.1, p.38-43, 1997.

HANSON, L.A. Breastfeeding provides passive and likely long-lasting active immunity. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v.81, n.6, p.523-537, 1998.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W.C.; PAULA, H. de. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e saúde humana. **Revista de Nutrição**, v.19, n.4, p.479-488, 2006.

HART, S. L.; BOYLAN, L. M.; CARROL, S. R.; MUSICK, Y. A.; KURATKO, C.; BORDER, B. G.; LAMPE, R.M. Brief report newborn behavior differs with docosahexaenoic acid levels in breast milk. **Journal of Pediatric Psychology**, v.32, n.2, p.221-226, 2006.

HECK, A. R. Controle de qualidade da coleta à distribuição. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BLH, 3., 2002, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto, SP, 2002.

_____. Processamento do leite humano ordenhado. In: APRILE, M. M.; FEFERBEUM, R. **Banco de leite humano**. São Paulo: Atheneu, 2011. p.29-42.

HECK, A. R.; FERREIRA, E. M. Qualidade físico-química do leite humano. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE BANCO DE LEITE HUMANO, 1., 2000, Natal. **Anais...** Natal, 2000.

HEIMAN, H.; SCHANLER, R. J. Benefits of maternal and donor human milk for premature infants. **Early Human Development**, v.82, n.12, p.781-787, 2006.

HUMAN MILK BANKING ASSOCIATION OF NORTH AMERICA (HMBANA). **Guidelines for establishment and operation of a donor human bank**. Raleigh, NC, 2003. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/PediatricAdvisoryCommittee/UCM235619.pdf>>. Acesso em: 02 jul. 2013.

IBERBLH. **Boletim dela Red de Bancos de Leche Humana**, n.184, p.7, 14 marzo 2014. Disponível em: <www.iberblh.org>. Acesso em: 23 mar. 2014.

INNIS, S. M. Perinatal biochemistry and physiology of long-chain polyunsaturated fatty acids. **Journal of Pediatric**, v.143, (4 Suppl), p.S1-8. 2003.

JENSEN, C. L.; LAPILLONNE, A. Docosahexaenoic acid and lactation. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.81, n.2-4, p.175-178, 2009.

JENSEN, R. G. Lipids in human milk. **Lipids**, v.34, n.12, p.1243-1271, 1999.

KAMIYA, E.; RAMOS, M. I. L. Avaliação microbiológica e calórica do leite humano coletado e distribuído no Banco de Leite Humano do Hospital universitário da UFMS. **Higiene Alimentar**, v.17, n.109, p.64-68, 2003.

KENNER, C. Nutrição infantil. In: REICHMANN, A. **Enfermagem neonatal**. 2.ed. Rio de Janeiro: Reichmann & Afonso Editores, 2001. p.111-157.

KENT, J. C.; MITOULAS, L. R.; CREGAN, M. D.; RANSAY, D. T.; DOHERTY, D.A.; HARTMANN, P. E. Volume and frequency of breastfeeding and fat content of breast milk throughout the day. **Pediatrics**, v.117, n.3, 387-395, 2006.

KING, F. S. **Como ajudar as mães a amamentar**. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 1998.

KOCISZEWSKA-NAJMAN, B.; BOREK-DZIECIOL, B.; SZPOTARNSKA-SIKORSKA, M.; WILKOS, E.; PIETRZAK, B.; WIETGOS, M. The creatinocrit, fat and energy concentration in human milk produced by mothers of preterm and term infants. **Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v.5, n.9, p.1599-1602, 2012.

KOLETZKO, B.; RODRIGUES-PALMERO, M.; DEMMELMAIR, H.; FIDLER, N.; JENSEN, R.; SUAERWALD, T. Physiological aspects of human milk lipids. **Early Human Development**, v.65, n.2, p.3-18, 2001.

KOPELMAN, B. I.; SANTOS, A. M. N.; GOULART, A. L.; ALMEIDA, M. F. B.; MIUOSHI, M.; GUINSBURG, R. **Diagnóstico e tratamento em neonatologia**. São Paulo: Atheneu, 2004.

KOUTRAS, A. K.; VIGORITA, V. J. Fecal secretory immunoglobulin A in breast Milk VS formula feeding in early infancy. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.9, n.1, p.58-61, 1989.

KUNZ, C.; LONNERDAL, B. Re-evaluation of the Whey protein/casein ratio of human milk. **Acta Paediatrica**, v.81, n.2, p.107-112, 1992.

LAMOUNIER, J. A.; LEÃO, E. Nutrição na infância. In: OLIVEIRA, J. E. D.; MARCHINI, J. **Ciências nutricionais**. São Paulo: Sarvier, 2008. p.216-237.

LAMOUNIER, J. A.; VIEIRA, G. O.; GOUVEA, L. C. Composição do leite materno. In: REGO, J. D. **Aleitamento materno**. São Paulo: Atheneu, 2002. p.47-58.

LANG, S.; LAUREWCE, C. J.; ORME, R. L. Cup feeding: an alternative method of infant feeding. **Archives of Disease in Childhood**, v.71, n.4, p.365-369, 1994.

LARSON, E.; ZULLI, R.; ZIER, V.; BERG, B. Storage of human milk. **Infection Control**, v.5, n.3, p.127-130, 1984.

LAWRENCE, R. Storage of human milk and the influence of procedures on immunological components of human milk. **Acta Paediatrica**, v.88, n.430, p.14-18, 1999.

LAWRENCE, R. A.; LAWRENCE, R. M. Breastfeeding the premature infant. In: _____. **Breastfeeding**: a guide for the medical profession. 6th ed. St Louis: Mosby, 2005. p.479-514.

LIMA, V. P.; MELO, A. M. Cup-feeding in Kangaroo mother care. **Revista CEFAC**, v.10, p.126-133, 2008.

LIN, H. Y.; HSIEH, H. Y.; CHEN, H. H.; CHIU, H. Y.; LIN, H. C.; SU, B.H. Efficacy of creatumocrit technique in evaluation of premature infants fed with breast milk. **Pediatrics and Neonatology**, v.52, n.3, p.130-134, 2011.

LIRA, B. F. **Qualidade da fração lipídica do leite humano ordenhado e processado**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.

LIRA, B. F.; CRUZ, E. Estocagem. In: BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Banco de leite humano**: funcionamento, prevenção e controle de riscos. Brasília: ANVISA, 2008. p.105-110.

LONNERDAL, B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.77, n.6, p.1537-1543, 2003.

LOPES, L. A.; AMÂNCIO, O. M.; JULIANO, Y. Influência do congelamento na determinação de gordura total e do valor calórico total de colostro humano pelo método de creatumócrito. **Revista Paulista de Pediatria**, v.10, n.39, p.116-119, 1992.

LOUZADA, M. L. C.; SOLLA, N. P. Assistência de Enfermagem na manutenção do estado nutricional do recém-nascido. In: MIURA E.; PROCIANOY, R. S. **Neonatologia**: princípios e prática. 2.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. p.74-76.

LUCAS, A.; HUDSON, G.J. Preterm Milk as a source of protein for low birthweight infants. **Arch Dis Child**. v.59, p.831-836, 1984.

LUCAS, A.; COLE, T. J. Breast Milk and neonatal necrotizing enterocolitis. **Lancet**, v.336, n.8730, p.1519-1523, 1990.

LUCAS, A.; GIBBS, J. A. H.; LYSTER, R. L. J.; BAUM, J. D. Creamatocrit: simple clinical technique for estimating fat concentration and energy value of human milk. **British Medical Journal**, v.1, n.6119, p.1018-1020, 1978.

LUZEAU, R.; BARROIS, V.; ODIEVRE, M. Acide gras non estérifiés et acidité titrable du lait maternel. **Archives Francaises de Pédiatrie**, v.6, n.40, p.449-451, 1983.

MacCHIAVERNI, P.; FRAZÃO, J. B.; ARSLANIAN, C.; PALMEIRA, P.; SEVERINO, S. D.; CONDINO-NETO, A. Aquisição passiva de anticorpos anti-dermatofagoides pteronyssinus através de passagem transplacentária e aleitamento materno. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, v.31, p.23-30, jan./fev. 2008.

MACIAS, S. M.; RODRIGUES, S.; RONAYNE, P. F. Leite materno: composição e fatores condicionantes da lactação. **Archivos de Pediatría**, São Paulo, v.104, p.423-430, 2006.

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. Lipídeos. In: **Krause**: alimentos, nutrição e dietoterapia. 9.ed. São Paulo: Roca, 1998. p.51-53.

MAKRIDES, M.; NEUMANN, M.; JEFFREY, B.; LIEN, E.L.; GIBSON, R. A randomized trial of different ratios of linoleic to alpha-linolenic acid in diet of term infants: effects on visual function and growth. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.71, n.1, p.120-129, 2000.

MAKRIDES, M.; NEUMANN, M.; SIMMER, K.; PATER, J.; GIBSON, R. Are long-chain polyunsaturated fatty acids essential nutrients in infancy. **Lancet**, v.345, n.8963, p.1463-1468, 1995.

MAKRIDES, M.; SIMMER, K.; GOGGIN, M.; GIBSON, R. A. Erythrocyte docosahexaenoic acid correlates with the visual response of healthy term infants. **Pediatric Research**, v.33, n.4, p.425-427, 1993.

MARGOTTO, P. R. **Assistência ao recém-nascido de risco**. 2ed. Pórfiro: Brasília, 2006.

MARIN, C. M.; SANJURJO, A. L.; SAGER, G.; MARGHERITUS, C.; ALANIZ, M. J. T. Composición en ácidos grasos de leche de madres de recién nacidos de pretérmino y de término. **Arch Argent Pediatr**. v.107, n.4, p.315-320, 2009.

MARINELLI, K. A.; BURKE, G. S.; DODD, V. L. A comparison of the safety of cupfeedings and bottlefeedings in premature infants whose mothers intend to breastfeed. **Journal of Perinatology**, n.16, n.29-38, 2001.

MARINETTI, K. A.; HAMELIN, K. Breastfeeding and the use of human milk in the neonatal intensive care unit. In: AVERY, G. B.; MacDONALD, M. G.; SESHIA, M. M. K.; MULLETT, M. D. **Avery's neonatology**: pathophysiology & management of the newborn. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. p.429.

MASTROENI, S. B. S.; OKADA, I. A.; RONDÓ, P. H. C.; DURAN, M. C.; PAIVA, A. A.; NETO, J. M. Concentrations of Fe, K, Na, Ca, P, Zn and Mg in maternal colostrum and mature Milk. **Journal of Tropical Pediatrics**, v.52, p.272-275, 2006.

MATTAR, M. J. G.; QUINTAL, V. S. Banco de Leite Humano. In: ISSLER, H. **O aleitamento materno no contexto atual**: políticas, prática e bases científicas. São Paulo: Sarvier, 2008. p.541-559.

MAYANS, D. E.; MARTELLI, M. Estimación del valor calórico del leche materna mediante La técnica del crematócrito. **Revista Médica del Uruguay**, v.10, p.160-164, 1994.

_____. Control de calidad de La leche materna. **Jornal de Pediatria** (Rio J.), v.75, n.3, p.11-18, 1999.

McCLURE, R. J.; NEWELL, S. J. Effect of fortifying breast milk on gastric emptying. **Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition**, v.74, n.1, p.60-62, 1996.

MEIER, P. P.; ENGSTROM, J. L.; MURTAUGH, M. A.; VASAN, U.; MEIER, W. A.; SCHANLER, R. J. Mothers' milk feedings in the Neonatal Intensive Care Unit: Accuracy of the creatinocrit technique. **Journal of Perinatology**, v.22, n.8, p.646-649, 2002.

MENA, N. P. Cuando y como iniciar La alimentación enteral en el premature extreme. **Revista Chilena de Pediatría**, v.72, n.5, p.247-250, 2005.

MENCONI, S. D. Banco de leite humano. In: CARVALHO, M. R.; TAVARES, L. A. M. **Amamentação**: bases científicas. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. p.64-81.

MINDA, H.; KOVACS, A.; FUNKE, S.; SZÁSZ, M.; BURUS, I.; MOLNAR, S.; MAROSVOLGYI, T.; DECSI, T.; Changes of fatty composition of human Milk during the first month of lactation: a day-to-day approach in the first week. **Annals of the Nutrition e Metabolism**, v.48, n.3, p.202-209, 2004.

MIRANDA, M.; MURIACH, M.; ALMANSA, I.; JARENO, E.; BOSCH-MORELL, F.; ROMERO, F. J.; SILVESTRE, D. Estado oxidativo do leite humano e suas variações durante o armazenamento refrigerado. **Biofactors**, v.20, n.3, p.129-137, 2004.

MITTUE, S. C. **Perfil sócio econômico e ambiental de doadores de um Banco de Leite Humano no vale da Paraíba, São Paulo e a qualidade sanitária do leite humano ordenhado**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Universidade de Taubaté, SP, São Paulo, 2010.

MORAES, P. S.; OLIVEIRA, M. M. B.; DALMAS, J. C. Perfil calórico do leite pasteurizado no banco de leite humano de um hospital escola. **Revista Paulista de Pediatria**, São Paulo, v.31, n.1, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-05822013000100008>. Acesso em: 15 jul. 2014.

MORAES, P. S.; OLIVEIRA, M. M. B.; DALMAS, J. C. Perfil calórico do leite humano no Banco de leite Humano do Hospital Universitário de Londrina. In: ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 19., 2010, Guarapuava. **Anais...** Guarapuava (PR), 28-30 out. 2010.

MORGANO, M. A.; NETO, J. M.; RONDÓ, P. H. C.; SOUZA, L. A. Composição mineral do leite materno de Bancos de Leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, n.25, v.4, p.819-824, out./dez. 2005.

MORLEY, R.; LUCAS, A. A influence of early diet on outcome in preterm infants. **Acta Paediatrica**, v.405, p.123-126, 1994.

_____. Randomized diet in the neonatal period and growth performance until 7,5-8y of age in preterm children. **American Journal of Clinical Nutrition**. v.71, p.822-828, 2000.

MOURA, E. C. Nutrição. In: CARVALHO, M. R.; TAVARES, L. A. M. **Amamentação, bases científicas**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. p.36-63.

MURASE, M.; MIZUNO, K.; NISHIDA, Y.; MIZUNO, N.; TAKI, M.; YOSHIZAMA, M.; ITABASHI, K.; MUKAI, Y. Comparison of creatinocrit and protein concentration in each mammary lobe of the same breast: does the milk composition of each mammary lobe differ in the same breast?. **Breastfeed Med**, v.4, n.4, p.189-195, 2009.

NASCIMENTO, M. B. R. do; ISSLER, H. Breastfeeding: making the difference in the development, health and nutrition of term and preterm newborns. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v.58, n.1, p.49-60, jan./fev. 2003.

_____. Aleitamento materno em prematuros: manejo clínico hospitalar. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v.80, n.5 (supl), p.163-172, 2004.

_____. Breastfeeding the premature infant: Experience of Baby Friendly Hospital in Brazil. **Journal of Human Lactation**, v.21, n.1, p 47-52, 2005.

NEIVA, F. C.; LEONE, C. R. Evolução do ritmo de sucção e influência da estimulação em prematuros. **Pró-Fono**, v.19, n.3, p.58-64, 2007.

NETTLETON, J. Are n-3 fatty acids essential nutrients for fetal and infant Development. **Journal of the American Dietetic Association**, v.93, n.1, p.58-64, 1993.

NEWMANN, J. How breast Milk protects newborns. **Scientific American**, n.4, p.76-79, 1995.

NYQVIST. K.H. Lack of knowledge persist about early breastfeeding competence in preterm infants. **J. Human Lactation**. V. 29, n. 3, p. 269-299, 2013

NOBREGA, F. J.; CAMPOS, A. L. R. **Distúrbios nutricionais e fraco vínculo mãe/filho**. Rio de Janeiro: Revinter, 1996.

NOVAK, F. R. Sobre o tempo de congelamento do leite materno(2 meses). **Grupo Virtual de Amamentação**, 30 nov. 2013 Disponível em: <<http://grupovirtualdeamamentacao.blogspot.com.br/2013/11/sobre-o-tempo-de-congelamento-do-lm-2.html>>. Acesso em: 26 mar. 2013.

NOVAK, F. R.; ALMEIDA, J. A. G. Controle de qualidade em bancos de leite humano. In: APRILE, M. M.; FEFERBAUM, R. **Banco de leite humano**. São Paulo: Atheneu, 2011. p.47-55.

_____. Testes alternativo para detecção de coliformes em leite humano ordenhado. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v.78, n.3, p.587-591, 2002.

NOVAK, F. R.; ALMEIDA, J. A. G.; ASENSI, M. D.; MORAES, B. A., RODRIGUES, D. P. Resistência antimicrobiana de coliformes isolados de leite humano ordenhado. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.17, n.3, p.713-717, 2001.

NOVAK, F. R.; CORDEIRO, D. M. B. Correlação entre população de microorganismos mesófilos aeróbios e acidez Dornic no leite humano ordenhado. **Jornal de Pediatria**, Porto Alegre, v.83, n.1, p.87-91, jan./fev. 2007.

NOVAK, F. R.; JUNQUEIRA, A. R.; DIAS, M. D de S. P.; ALMEIDA, J. A. G. Análise sensorial do leite humano ordenhado e sua carga microbiana. **Jornal de Pediatria**, (RJ), Porto Alegre, v.34, n.2, p.181-184, 2008.

O'CONNOR, D. L.; HALL, R.; ADAMKIN, D.; AUESTAD, N.; CASTILLO, M.; CONNOR, W. E.; CONNOR, S. L.; FITZGERALD, K.; GROH-WARGO, S.; HARTMANN, E. E.; JACOBS, J.; JANOWSKY, J.; LUCAS, A.; MARGESON, D.; MENA, P.; NEURINGER, M.; NESIN, M.; SINGER, L.; STEPHENSON, T.; SZABO, J.; ZEMON, V; ROSS PRETERM LIPID STUDY. Growth and development in preterm infants fed long-chain polyunsaturated fatty acids: a prospective, randomized controlled trial. **Pediatrics**, v.108, n.2, p.359-371, 2001.

O'CONOR, D. L.; KHAN, S.; WEISHUHN, K.; VAUGHAN, J.; JEFFERIES, A.; CAMPBELL, D. M.; ASZTALOS, E.; FELDMAN, M.; ROVET, J.; WESTALL, C.; WHYTE, H; POSTDISCHARGE FEEDING STUDY GROUP. Growth and nutrient intakes of human milk-fed preterm infants provided with extra energy and nutrients after hospital discharge. **Pediatrics**, v.121, n.4, p.766-776, 2008.

OLIVEIRA, M. C. C. **Práticas da amamentação, teores de vit. A no leite humano em diferentes fases da lactação segundo variáveis maternas**. 60p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Farmácia/UFGM, Belo Horizonte, 2003.

OMS. **Alimentação infantil: bases fisiológicas**. Genebra, 1989.

_____. **Estratégia Global para alimentação de crianças e adolescentes**. Genebra, 2003.

OMS/ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). **Evidências científicas dos dez passos para o sucesso no aleitamento materno**. Brasília (DF), 2001.

OMS/UNICEF. **Iniciativa Hospital Amigo da Criança**: revista, atualizada e ampliada para o cuidado integrado. Curso de 20 horas para equipes de maternidade. Módulo 3. Brasília: UNICEF, 2009.

OREGAN, M. D.; De MELLO, T. R.; KERSHAW, D.; MC DOWGALL, K.; HARTMANN, P. E. Initiation of lactation in women after preterm delivery. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v.1, n.9, p.870-877, 2002.

ORSHAN, S. A. **Enfermagem na saúde das mulheres**: das mães e dos recém-nascidos, o cuidado ao longo da vida. Tradução de Ana Tirrel, Celeste Inthy, Regina M. Garcez. Porto Alegre: Artmed, 2010.

OXTOPY, M. J. Human immunodeficiency virus and other viruses in human milk: placing the issues in broader perspective. **Journal Pediatric Infectious Disease**, v.7, n.12, p.825-835, 1988.

PANICHI, M. N.; STANCARI, R. C.; DIAS, F. L.; ANDRADE, C. B.; ASSIS, T. C.; BARRETINI, G. A. Manipulação do conteúdo energético do leite humano doado para otimização de seu conteúdo calórico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BANCOS DE LEITE HUMANO, 3., 2002, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro, 2002.

PANICHI, M. N.; STANCARI, R. C. A.; SUAIDEN, M. A. G.; GIMENES, N. O. Controle da qualidade do leite humano ordenhado processado no banco de leite humano de Bauru, SP/Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BLH, 5., 2010, Brasília. **Anais...**, Brasília, 2010. Disponível em: <<http://www.redeblh.fiocruz.br/media/trconblh10.pdf>>. Acesso em: 02 jun. 2014.

PAPAGEORGIOU, A.; BARDIN, C. L. The extremely-low-birthweight infant. In: AVERY, G. B., FLETCHER, M. A.; MacDONALD, M. G. **Neonatology**: Pathophysiology and Management of the Newborn. 5th ed. Philadelphia: Lippincott, 1999. p.445-472.

PASSANHA, A.; MANCUSO, A. M. C.; SILVA, M. E. M. P. Elementos protetores do leite materno na prevenção de doenças gastrointestinais e respiratória. **Revista Brasileira de Crescimento e Desenvolvimento Humano**, São Paulo, v.20, n.2, p.351-360, 2010.

PATIN, R. V.; VITOLO, M. R.; VALVERDE, M. A.; CARVALHO, P. O.; PASTORE, G. M.; LOPEZ, F. A. The influence of sardine consumption on the Omega-3 fatty acid content of mature human milk. **Jornal de Pediatria**, v.86, n.1, p.63-69, 2006.

PESSOTO, M. A.; MARBA, S. T. M.; CARDOSO, S. M. S. Qualidade físico-química do leite ordenhado por diferentes métodos de ordenha. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BLH, 5., 2010, Brasília. **Anais...** Brasília, 2010a. Disponível em: <<http://www.redeblh.fiocruz.br/media/trconblh10.pdf>>. Acesso em: 02 jun. 2014.

_____. Avaliação da lactação em mães de recém-nascido pré-termo com peso de nascimento inferior a 1.250 gramas segundo diferentes métodos de ordenha: ordenha manual, com bomba manual ou com bomba elétrica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BLH, 5., 2010, Brasília. **Anais...**, Brasília, 2010.

PICCIANO, M. F. Nutrient composition of human milk. **Pediatric Clinics of North America**, v.48, n.1, p.53-67, 2001.

PORTAL BRASIL. **Brasil está entre os dez países com o maior número de partos prematuros, aponta OMS**. 04 maio 2012. Disponível em: <z materno. São Paulo: Atheneu, 2002.

_____. O papel do pai na amamentação. In: ISSLER, H. **O aleitamento materno no contexto atual**: políticas, práticas e bases científicas. São Paulo: Sarvier, 2008. p.11-17.

_____. Amamentando um prematuro. In: REGO, J. D. **Aleitamento materno**. São Paulo: Atheneu, 2009. p.285-293.

REINAUX, C. M. A. Enfoque da fisioterapia. In: CARVALHO, M. R.; TAVARES, L. A. M. **Amamentação, bases científicas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. p.199-205.

RIBEIRO, L. C.; KUZUHARA, J. S. W. Lactação. In: SILVA, S. M. C. S.; MURA, J. D' A. P. **Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia**. São Paulo: Roca, 2007. p.393-318.

RICCO, R. G.; DEL CIAMPO, L. A.; ALMEIDA, C. A. N. **Aleitamento materno**: puericultura, princípios e práticas, atenção integral à saúde da criança. São Paulo: Atheneu, 2000.

ROBLEDO, H. H.; ROMERO, K. T. Pré natal. In: ISSLER, H. **O aleitamento materno no contexto atual**: políticas, prática e bases científicas. São Paulo: Sarvier, 2008. p.130-134.

ROMAN, S. V.; LARA, N. R. G.; VIECO, D. E.; SANCHEZ, F. C.; BERTOLO, J. De la C.; ALONSO, C. R. P. Determination of dornic acidity as a method to select donor milk in a milk bank. **Breastfeeding Medicine**, v.8, n.1, p.99-104, 2013.

RONA, M. S. S; NOVAK, F. R.; PORTILHO, M.; PELISSARI, F. M.; MARTINS, A. B. T.; MATIOLI, G. Efeito do tempo e da temperatura de estocagem nas determinações de acidez, cálcio, fósfor proteínas e lipídios de leite de doadoras de bancos de leite humano. **Revista Brasileira de Saúde Materno infantil**, v.8, n.3, p.257-263, 2008.

RUGOLO, M. L. S. S. Crescimento e desenvolvimento a longo prazo de premature extreme. **Jornal de Pediatria**, v.21, n.5, p.1-3, 2005.

RUIZ J. G.; CHARPAK, N.; FIGUERO, Z. Predictional need for supplementing breastfeeding in preterm infants under kangaroo mother care. **Acta Paediatrica**, v.91, n.10, p.1130-1134, 2002.

SAIGAL, S. Funcionamento comportamental e emocional em bebês prematuros. In: **Enciclopédia sobre o Desenvolvimento na Primeira infância**. Quebec, Montreal. Center of Excellence for Early Childhood Development e Strategic Knowledge Cluster on Early Child Development, 2012. p.1-7. Disponível em: <<http://www.encyclopediacrianca.com/documents/saigalPORTxp.pdf>>. Acesso em: 04 jul. 2013

SAMIR, F.; ALMEIDA, F. P. V. A orientação e o incentivo da doação de leite materno para os bancos de leite humano durante o pré natal. **Revista de Pesquisa: cuidado é fundamental**, Rio de Janeiro, v.9, n.1/2, p.49-56, 2005.

SANDGRUBER, S.; MUCH, D.; AMANN-GASSNER, U.; HAUNER, H.; BUETTNER, A. Sensory and a molecular characterization of the protective effect of storage at -80 degrees C on the odour profiles of human milk. **Food Chemistry**, v.130, n.2, p.236-242, 2012.

SANTANA, M. C.; GOULART, B. N.; CHIARI, B. M.; MELO, A. M.; SILVA, E. H. Aleitamento materno em prematuros: atuação fonoaudióloga baseada nos pressupostos da educação para promoção de saúde. **Caderno de Saúde Coletiva**, v.15,n.2, p.411-417, 2010.

SCARSO, I. S. **Estudo dos fatores que condicionam acidez elevada em leite humano**: aspectos microbiológicos e nutricionais. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, USP, São Paulo, 2008.

SCARSO, I. S.; VALLE, R. V.; TEIXEIRA E. P.; FONSECA, Y. S. K.; ARINE, M. L. B.; SILVA, R. P.; DIAS, H. G.; CÂNDIDO, V. L. C.; PACHECO, M. A. S. R.; SANTOS, E. A. dos. Análise físico-química e bacteriológica do leite cru e pasteurizado do Banco de leite humano de Sorocaba, SP. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.20, n.142, p.85-89, jul. 2006.

SCHANLER, R. J. Suitability of human milk for the low-birthweight infant. **Clinics in Perinatology**, v.22, n.1, p.207-222, 1995.

_____. The use of human Milk for premature infants. **Pediatric Clinics of North America**, v.48, n.1, p.207-219, 2001.

SCHANLER, R. J.; HURST, N. M.; LAU, C. The use of human Milk and breastfeeding in premature infants. **Clinics in Perinatology**, v.26, n.2, p.379-398, 1999.

SCOCHI, C. G. S.; GAUY, J. S.; FUJINAGA, C. I.; FONSECA, L. M. M.; ZAMBERLAN, N. E. Transição alimentar por via oral em prematuros em um hospital amigo da criança. **Acta Paulista de Enfermagem**, v.23, n.4, p.540-545, 2010.

SERAFINI, A. B.; ANDRÉ, M. C. D. P. B.; RODRIGUES, M. A. V.; KIPNIS, A.; CARVALHO, C. O.; CAMPOS, M. R. H.; MONTEIRO, É. C.; MARTINS, F.; JUBÉ, T. F. N. Qualidade microbiológica do leite humano obtido em banco de leite. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.37, n.6, p.775-779, 2003.

SESA-PR. Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM)/Divisão de Informações Epidemiológicas (DVIEP)/Centro de Epidemiologia (CEPI)/Superintendência de Vigilância em Saúde (SVS)/Secretaria de Estado da Saúde do Paraná(SESA/PR). **Nascidos vivos - Paraná - de 1999 a 2014**. Disponível em: <<http://www.tabnet.sesa.pr.gov.br/tabnetsesa/dh?sistema/sinasc99diante/nascido>>. Acesso em: 14 maio 2014.

SETE, P. R. C.; ZUCOLOTTI, A.; PONTES, M. B. Amamentação na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal do Hospital Santa Casa de Vitória, ES: conhecimentos e práticas da equipe de enfermagem. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BLH, 5., 2010, Brasília. **Anais...** Brasília, 2010. Disponível em: <<http://www.redeblh.fiocruz.br/media/trconblh10.pdf>>. Acesso em: 02 ago. 2012.

SEVERINE, A. N.; NÓBREGA, F.J.; JULIANO, Y.; NOVO, N. F. Medida de energia total do leite materno de mães de trigêmeos, gêmeos e filhos únicos. **Revista Paulista de Pediatria**, São Paulo, v.26, n.2, p.151-155, 2008.

SILFVERDAL, S. A.; BODIN, L.; ULANOVA, M.; HAHN-ZORIC, M.; HANSON, L. A.; OLCEN, P. Long term enhancement of the IgG2 antibody response to Haemophilus influenza type b by breastfeeding. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v.21, n.9, p.816-821, 2002.

SILPRASERT, A.; DEJSARAI, W.; KEAWVICHIT, R. AMATAIAKUL, K. Effect of storage on the creatocrit and total energy content of human milk. **Human Nutrition. Clinical Nutrition**, v.41, n.1, p.31-36, 1987.

SILVA, A. C.; ALENCAR, K. P. C.; RODRIGUES, L. C. B.; PERILLO, V. C. A alimentação do prematuro por meio do copo. **Revista da Sociedade Brasileira de Fonoaudiologia**, São Paulo, v.14, n.13, p.387-393, 2009.

SILVA, F. F. **Qualidade do leite materno em banco de leite humano**: aspectos microbiológicos, físico-químicos e perfil de aminos bioativas. Dissertação (Mestrado) - UFMG, Belo Horizonte, 2008. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/>>. Acesso em: 28 jun. 2013.

SILVA, R. C.; ESCOBEDO, J. P.; GIOIELLI, L. A.; QUINTAL, V. S.; IBIDI, S. M.; ALBUQUERQUE, E. M. Composição centesimal do leite humano e caracterização das propriedades físico-químicas de sua gordura. **Química Nova**, São Paulo, v.30, n.7, 2007.

SILVA, T. C.; OLIVEIRA, C. Acidez e densidade calórica do leite humano ordenhado cru proveniente de doadoras externas e da sala de ordenha do Banco de Leite Humano de Dourados, MT. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BANCOS DE LEITE HUMANO, 5.; CONGRESSO IBEROAMERICANO DE BLH, 1.; FÓRUM DE COOPERAÇÃO INTERNACIONAL EM BLH/ABC/FIOCRUZ, 2010, Brasília. **Anais...** Brasília/DF, 2010.

SILVA, V. G.; ALMEIDA, J. A. G. Curva de crescimento bacteriano em leite humano ordenhado x acidez Dornic. In: CONGRESSO PAULISTA DE BANCOS DE LEITE, 1., 2005, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto, 2005.

SILVA, V.G. **Normas técnicas para banco de leite humano**: uma proposta para subsidiar a construção para boas práticas. Tese (Doutorado em Saúde da Mulher e da Criança) - Instituto Fernandes Figueira, Rio de Janeiro, 2004.

SILVESTRE, D.; MIRANDA, M.; MURIACH, M.; ALMANSA, L.; JARENO, E.; ROMERO, F. J. Frozen breast milk at -20 degrees C and -80 degrees C: a longitudinal study of glutathione peroxidase activity and malondialdehyde concentration. **Journal of Human Lactation**, v.26, n.1, p.35-41, 2010.

SIMPSON, C.; SCHANLER, R. J.; LAU, C. Early introduction of oral feeding in preterm infants. **Pediatrics**, v.110, n.3, p.517-522, 2002.

SOARES, F. V. M. **Avaliação do gasto energético e da utilização dos macronutrientes pelos recém-nascidos pré-termo alimentados com leite humano ou fórmula láctea**: ensaio clínico crossover. Tese (Doutorado em Saúde da Criança e da Mulher) - Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Fernandes Figueira, Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <<http://arca.iccit.ficruz.br/handle/icit/4081>>. Acesso em: 19 jul. 2013.

SOSA, R.; BARNES, L. Bacterial growth inrefrigerated human milk. **American Journal of Disease of Children**, v.5, n.3, p.127-130, 1987.

SOUSA, P. P. R.; SILVA, J. A. Monitoramento da qualidade do leite humano ordenhado e distribuído em banco de leite de referência. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.69, n.1, p.7-14, 2010.

SPEAR, M. L.; HAMOSH, M.; BITMAN J.; WOO, D. L. Milk and blood fatty acid composition during two lactation in the same woman. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.56, n.1, p.56-65, 1992.

SPITZER, J.; BUETTNER, A. Characterization of aroma changes in human milk during storage at -19 degrees C by quantification experiments. **Food Research International**, n.51, p.250-256, 2013.

STANCARI, R. C. A.; SUADEN, M. A. G.; GIMENES, I. Controle de qualidade do leite humano ordenhado processado no banco de leite humano de Baurú, São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BANCOS DE LEITE HUMANO, 5.; CONGRESSO IBEROAMERICANO DE BANCOS DE LEITE HUMANO, 1.; FÓRUM DE COOPERAÇÃO INTERNACIONAL EM BANCOS DE LEITE HUMANO - ABC/Fiocruz, 2010. Brasília. **Anais...** Brasília/DF, 28-30 set. 2010.

STRIKER, G. A. J.; CASANOVA, L. D.; NAGAO, A. T. Influência do tipo de parto sobre a concentração de imunoglobulinas A, G, e M no colostro materno. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v.2, n.4, p.67-71, abr./jun. 2004.

SVENSSON, M.; HAKANNSSON, A.; MOSSBERG, A. K.; LINSE, S.; SVANBORG, C. Conversion of alpha-lactalbumin to a protein inducing apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.97, n.8, p.4224-4226, 2000.

TANAKA, A. Y.; BASSAN, J. C.; MARINELLI, P. S.; TEIXEIR, C. C.; MENDONÇA, N.; DOMINGUES, A. C. M. C.; DOMINGUES, S. M. O. Avaliação da qualidade de leite humano pasteurizado relacionando acidez dornic e contaminação bacteriana em banco de leite humano de Marília-SP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BANCOS DE LEITE HUMANO, 5.; CONGRESSO IBEROAMERICANO DE BANCOS DE LEITE HUMANO, 1.; FÓRUM DE COOPERAÇÃO INTERNACIONAL EM BANCOS DE LEITE HUMANO - ABC/Fiocruz, 2010, Brasília. **Anais...** Brasília/DF, 28-30 set. 2010. Disponível em: <<http://www.redeblh.fiocruz.br/media/trconblh10.pdf>>. Acesso em: 14 jul. 2014.

TERUYA, K.; COUTINHO, S. B. Sobrevivência infantil e aleitamento materno. In: REGO, J. D. **Aleitamento materno**. São Paulo: Atheneu, 2001. p.5-20.

TIJERINA-SAENZ, A.; INNIS, S. M.; KITTS, D. D. Antioxidant capacity of human Milk its association with vitamins A and E and fatty acid composition. **Acta Paediatrica**, v.98, n.11, p.1793-1798, 2009.

TINOCO, S. M. B.; SICHIERI, R.; MOURA, A. S.; SANTOS, F. S.; CARMO, M. G. T. Importância dos ácidos graxos essenciais e os efeitos dos ácidos graxos *trans* do leite materno para o desenvolvimento fetal e neonatal. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.23, n.3, p.525-534, 2007.

TOMA, T. S.; REA, M. F. Benefícios da amamentação para a saúde da mulher e da criança: um ensaio sobre as evidências. **Cadernos de Saúde Pública**, n.24, (Supl 2), p.25-46, 2008.

UAUY, R.; HOFFMAN, D. R.; PEIRANO, P.; BIRCH, D. G.; BIRCH, E. E. Essential fatty acids in visual and brain development. **Lipids**, v.36, n.9, p.885-895, 2001.

UNICEF/BRASIL. **Estudo faz alerta sobre a situação da prematuridade no Brasil.** Disponível em: <http://www.unicef.org/brazil/pt/media_25849.htm>. Acesso em: 14 maio 2014.

VALDÉS, V.; SÁNCHEZ, A.P.; LABBOCK, M. **Manejo clínico da lactação:** assistência à nutriz e ao lactente. Rio de Janeiro: Revinter, 1996. 128p.

VALENTINE, C. J.; HURST, N. M.; SCHANLER, R. J. Hindmilk improves weight gain in low birth-weight infants fed human milk. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, n.18, p.474-477, 1994.

VANNUCHI, M. T. O.; MONTEIRO, C. A.; REA, M. F.; SELMA, M.; MATSUO, T. Iniciativa hospital amigo da criança e aleitamento materno em unidade de neonatologia. **Revista de Saúde Pública**, v.38, n.3, p.415-421, 2004.

VENÂNCIO, S. I.; ALMEIDA, H. Método mãe canguru: aplicação no Brasil, evidências científicas e impacto sobre o aleitamento materno. **Jornal de Pediatria**, v.80, n.5, p.173-180, 2004.

VERNACCHIO, L.; LESKO, S. M.; VEZINA, R. M.; CORWIN, M. J.; HUNT, C. E.; HOFFMAN, H. J.; MITCHELL, A. A. Racial/ethnic disparities in the diagnosis of otitis media in infancy. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v.68, n.6, p.795-804, 2004.

VICTORA, C. G. Mortalidade por diarreia: o que o mundo pode aprender com o Brasil. **Jornal de Pediatria** (Rio de Janeiro), v.85, n.1, p.21-27, 2009.

VICTORA, C. G. No Brasil, 11,7% dos bebês são prematuros. **Jornal Folha de S.Paulo**, 05 ago. 2013. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/equilibrioesaude/2013/08/1322087-no-brasil-117-dos-bebes-sao-prematuros.shtml>>. Acesso em: 03 mar. 2014.

VICTORA, C. G.; VAUGHAN J. P.; LOMBARDI, C.; FUCHS S. M. C.; GIGANTE, L. P.; SMITH P. G.; NOBRE, L. C.; TEIXEIRA, A. M. B.; MOREIRA, L. B.; BARROS, F. C. Evidence for protection by breastfeeding against infants deaths from infectious diseases in Brazil. **Lancet**, v.330, n.8554, p.319-322, 1987.

VIEIRA, A. A.; MOREIRA, M. E. L.; ROCHA, A. D.; PIMENTA, H. P.; LUCENA, S. L. Análise do conteúdo energético do leite humano administrado a recém-nascidos de muito baixo peso ao nascimento. **Jornal de Pediatria**, v.80, n.6, p.490-494, 2004.

VIEIRA, A. A.; SOARES, F. V. M.; PIMENTA, H. P.; ABRANCHES, A. D.; MOREIRA, M. E. L. Analysis of the influence of pasteurization, freezing/thawing, and offer processes on human milk's macronutrient concentrations. **Early Human Development**, v.87, n.8, p.577-580, 2011.

VINAGRE, R. D. **Análise crítica do uso de leite humano procedente de banco de leite humano na alimentação do recém-nascido prematuro**. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

_____. **O uso do leite humano procedente de banco de leite humano na alimentação do recém-nascido prematuro**. São Paulo: Atheneu, 2001.

VINAGRE, R. D.; DINIZ, E. M. A. **O leite humano e sua importância na nutrição do recém-nascido prematuro**. São Paulo: Atheneu, 2002.

VISALLI, N.; SEBASTIANI, L.; ADORISIO, E.; CONTE, A.; DE CICCIO, A. L.; D'ELIA, R.; MANFRINI, S.; POZZILLI, P.; IMDIAB GROUP. Environment risk factors for type 1 diabetes in Rome and province. **Archives of Disease in Childhood**, v.88, n.8, p.695-698, 2003.

WANG, C. D.; CHU, P. S.; MELLEN, B. S.; SHENAI, J. P. Creamatocrit and the nutrients composition of the human milk. **Journal of Perinatology**, v.19, n.5, p.343-346, 1999.

WEBER, A.; LOUI, A.; JOCHUM, F.; BUHRER, C.; OBLADEN, M. Breast Milk from mothers of very low birthweight infants: variability in fat and protein content. **Acta Paediatrica**, v.90, n.7, p.772-775, 2001.

WIGHT, N. E. Donor human milk for preterm infants. **Journal of Perinatology**, n.21, v.4, p.249-254, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The optimal duration of exclusive breastfeeding: systematic review**. Geneva, 2001.

_____. **Global strategy for infant young child feeding**. Geneva, 2003.

_____. **Evidence on the long-term effects of breastfeeding: systematic review and meta-analyses**. Geneva, 2007. 52p.

_____. 15 millones de bebés nacen demasiado pronto. Centro de Prensa. Nueva York. 2 de Mayo, 2012. Disponível em:
http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2012/preterm_20120502/es/

YAMAWAKI, N.; YAMADA, M.; KAN-NO, T.; KOJIMA, T., KANEDO, T; YONEKUDO, A. Macronutrient, mineral and trace element composition of breast milk from Japanese women. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.9, n.2, p.171-181, 2005.

ZAVASCHI, M. L. S.; KUHENBECKER, R. Aspectos psicológicos do aleitamento materno. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, v.13, n.2, p.77-82, 1991.

ZELKOWITZ, P. Prematuridade e seu impacto sobre o desenvolvimento psicossocial e emocional da criança. In: **Enciclopédia sobre o desenvolvimento na primeira infância**. Montreal, Quebec: Centre of Excellence for Early Childhood Development e Strategie Knowledge Cluster on Early Child Development: 2012. p.1-5. Disponível em: <<http://www.encyclopediacrianca.com/documentos/ZelcowitzPRTxp.pdf>>. Acesso em: 04 jul. 2013.

PRODUÇÃO ACADÊMICA

Journal of Human Lactation

Effects of storage methodologies and time on the acidity and energy value of raw human milk from mothers with infants admitted to a neonatology unit

Journal:	<i>Journal of Human Lactation</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Research
Keywords:	acidity, Brazil, Breastfeeding, energy, human milk bank, preterm, quality, term

SCHOLARONE™
Manuscripts

Review

**EFEITO DOS DIFERENTES MODOS E TEMPOS DE ESTOCAGEM SOBRE A
ACIDEZ E O VALOR CALÓRICO DO LEITE HUMANO ORDENHADO CRU DE
MÃES COM RECÉM-NASCIDOS INTERNADOS EM UMA UNIDADE DE
NEONATOLOGIA**

Maria C. B. Grazziotin^{1,2,*}; Ana Laura Grazziotin^{3,4}; Marcia H. S. Freire⁵; Regina P. G. V. C. da Silva⁶

¹ Mestranda. Saúde da Criança e do Adolescente, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brasil.

² Enfermeira-chefe. Banco de Leite Humano do Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brasil

³ Doutoranda. Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes, RJ.

⁴ Doutoranda. National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, Estados Unidos da América

⁵ Doutora. Pesquisadora, Departamento de Enfermagem, Setor de Ciências da Saúde Universidade Federal do Paraná.

⁶ Doutora. Pesquisadora, Departamento de Pediatria, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brasil.

* Author de Correspondência:

Maria Celestina B. Grazziotin

Rua General Carneiro, 181, 4.º andar – Alto da Glória, CEP 80060-900 - Curitiba, PR
Tel.: (41) 3360-1867

E-mail: celestinabg@gmail.com

Agradecimentos:

Às funcionárias do banco de leite humano do Hospital de Clínicas que colaboraram na busca ativa das doadoras para o estudo.

RESUMO

Introducao: Em unidades de Neonatologia, os recém-nascidos impossibilitados de sugar podem receber leite humano cru, refrigerado ou congelado. A principal preocupação está relacionada à viabilidade do leite que sera ofertado ao neonato, e por isso estudos sobre as alterações da sua composição e qualidade nestas condições se tornam necessarios. **Objetivo:** Analisar os efeitos de diferentes modos e tempos de estocagem sobre a acidez e valor calórico do leite humano cru de mães com crianças internadas em uma Unidade de Neonatologia. **Métodos:** Foram analisadas 100 amostras de leite humano coletadas em ambiente específico no BLH. Foram coletados 30 mL de cada doadora numa mesma ordenha e imediatamente subdivididas em três amostras e analisadas: 1. tempo zero, 2. após 12 horas sob refrigeração ($\leq 5^{\circ}\text{C}$), e 3.com 15 dias sob congelamento (-16°C a -26°C). O grau de acidez foi determinado pela técnica de titulação *Dornic* e o valor calórico pela técnica de crematócrito. Analises estatísticas foram conduzidas utilizando o teste de Friedman, e o coeficiente de correlação de Spearman com nível de significância de 5%. **Resultados:** A análise de acidez apresentou médias de $2,8 \pm 0,9\text{D}$ para o tempo zero e de $3,1 \pm 0,9\text{D}$ para os leites refrigerado e congelado. Não houve diferença de acidez nas amostras sob refrigeração 12 horas e congelamento 15 dias. Os valores caloricos não apresentaram diferença estatisticamente significativa e os valores médios em Kcal/100mL encontrados foram de $56,5 \pm 15,8$ para leite fresco, de $55,8 \pm 14,1$ para leite refrigerado e de $55,9 \pm 14,2$ para o congelado. Observou-se fraca correlação entre a variação de AD e VC. **Conclusões:** Embora a acidez do leite humano tenha apresentado alterações conforme o modo e tempo de estocagem, todos valores se mantiveram dentro do limite recomendado para uso (8°D). Os valores calóricos encontrados estão de acordo com a literatura e as alterações não foram consideradas estatisticamente significativas após refrigeração e congelamento.

Palavras-chave: Aleitamento materno, estocagem do leite humano, prematuridade, recém-nascido prematuro, Banco de Leite Humano, Controle de qualidade em BLH, acidez leite humano.

INTRODUÇÃO

A qualidade de vida e o desenvolvimento dos recém-nascidos (RN) de termo e prematuros, entre muitos aspectos relacionados ao cuidado neonatal, depende também da nutrição que recebem^{1,2,3,4,5}. Evidências científicas apontam os benefícios do LH na saúde destas crianças e os prejuízos aos que não o recebem^{4,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17}. A primeira opção recomendada é o leite cru exclusivo da mãe (LME) ao filho pela sua composição diferenciada, espécie-específica, homóloga e o alimento mais próximo ao que seria oferecido pela nutrição intra-útero, quando se refere aos recém-nascido prematuros (RNPT)^{1,6,7,14,18}.

Nas situações de impedimento para o RN sugar, o LME pode ser ofertado cru fresco ou estocado sob refrigeração por 12 horas em temperatura de até 5°C ou sob congelamento por 15 dias em temperaturas inferiores a -3°C para uso posterior^{19,20}, desde que coletado em ambiente exclusivo, com rigor higiênico, paramentação adequada e o cuidado com os materiais utilizados no procedimento^{3,15,19}. Mesmo nas instituições que possuem Banco de Leite Humano, a prioridade deve ser LME cru, uma vez que a velocidade de crescimento é maior nas crianças que o recebem em comparação com o LH processado^{5,6,11,12,21,22} que pode apresentar menor taxa calórica, perdas parciais ou totais de componentes, como fatores de proteção e não atender integralmente às necessidades do RNPT^{23,24,25,26,27}.

Hospitais que possuem o título 'Amigo da Criança'²⁶ e o método Canguru^{27,28} estimulam o uso do LME cru fresco, ordenhado imediatamente antes do horário prescrito para administração^{1,27}. Além disto, o LME cru pode administrado na ausência da mãe, através da ordenha mais frequente e de maior volume de leite, que pode ser estocado em vários frascos estéreis com a quantidade aproximada para cada horário, conforme prescrição. Esta prática, porém, não é comum nas instituições que possuem Unidades de Neonatologia.

Para avaliar a qualidade do LH ordenhado cru (LHOC), existem métodos de análise, como a titulação de acidez e o crematócrito. O primeiro representa o controle higiênico-sanitário, que garante a qualidade físico-química do LH, pois, uma acidez elevada implica em redução do valor nutricional, perda de lactose, desestabilização das micelas de caseína, indisponibilização do cálcio e fósforo e está associada à contaminação microbiana ou à oxidação e lipólise do LH devido ao manejo e estocagem inadequadas com o LHOC; O segundo identifica o valor calórico do LH,

que é determinado pela porcentagem de creme (a gordura do LH), possibilitando a prescrição conforme a necessidade do RNPT^{24,29,30,31,32}.

A manutenção da qualidade do LME cru é fundamental para o crescimento, desenvolvimento e proteção do RN contra infecções. Esta prática também leva à diminuição do uso de leite artificial, à aproximação da mãe como parte integrante da recuperação do filho e à manutenção do aleitamento materno^{2,25}. O importante é que o LME seja a base nutricional e o alimento preferido, mesmo nas situações que exigem a alternância com fórmulas ou aditivos, para atender à necessidade dos prematuros extremos e de muito baixo peso.

Acredita-se que uma das razões para o não aproveitamento do LME cru estocado, é a falta de conhecimento e de capacitação dos profissionais com o manejo do LME ordenhado cru, nas instituições que não possuem BLH, levando ao impedimento, a restrições ou atrasos na amamentação para muitas mães e suas crianças. Diante disto decidiu-se por este estudo, como apoio científico aos profissionais de saúde da área de Neonatologia para a prática com o manejo do LME cru, mostrando quais são os efeitos sobre acidez e valor calórico do LHOC, quando submetido a diferentes tempos e modos de estocagem, até ser administrado aos RN

MÉTODOS

Realizou-se um estudo observacional, analítico, de coorte prospectivo no BLH do Hospital de Clínicas (HC), Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba (PR), com 100 amostras de LME doado por 100 mães com RN internados na unidade Neonatologia no período de Março a Junho de 2013, que vieram ao BLH para estimular e manter a lactação ou extrair o excesso de volume. Receberam orientações sobre a técnica de coleta, higiene, e paramentação, seguindo um *check list*³³ e foram acompanhadas em sala específica durante o procedimento pelo pesquisador que auxiliou na ordenha manual ou com esgotadeira elétrica. As amostras (30 mL no mínimo) foram coletadas no período da manhã, entre 08 e 12:30 horas, em um único frasco de vidro com tampa de plástico, estéril, de uma só vez, em seguida homogeneizado e separado em três porções iguais em outros 3 frascos para as análises. Uma das amostras foi analisada imediatamente em tempo considerado zero e fresco (LHF); a segunda, refrigerada por 12 horas (LHR) e a terceira congelada por 15 dias (LHC) e analisadas após o tempo de estocagem. Foram utilizadas as técnicas de análise padrão da Rede Brasileira de BLH (rBLH-BR, a

titulação de acidez *Dornic* para o grau de acidez (AD) e o crematócrito para o valor calórico (VC) do leite humano cru¹⁹. (Figura 1).

Os resultados dos VC mensurados nos LHF, LHR e LHC foram organizados em 04 faixas a partir do menor valor encontrado (39,0 Kcal/100mL), de maneira a torná-los comparáveis com a literatura e registrados em planilhas específicas.

Para análise descritiva foram determinadas as frequências e porcentagens das diversas variáveis qualitativas e medidas de tendência central e dispersão (média, desvio-padrão, mediana). As variáveis respostas da pesquisa foram a AD e o VC do LH, analisados sob 3 tempos e formas de estocagem.

Após análise global (100 amostras), as amostras foram divididas em dois grupos: leite Termo e leite Prematuro. O teste de Friedman foi utilizado para verificar o efeito do tempo de estocagem nas variáveis respostas e o teste U de Mann-Whitney foi usado para comparar os grupos. Para análise da correlação entre AD e VC foi usado o coeficiente de correlação de Spearman e os critérios para classificar a intensidade da relação: $<0,10$ nula; de $0,10 < 0,50$ fraca; de $0,50 < 0,70$ moderada e $\geq 0,70$ forte. Em todos os testes foi utilizado um nível de significância de 5%. Os dados foram digitados em planilhas eletrônicas do programa Microsoft Excel® e analisados com auxílio do programa Bioestat®.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC-UFPR sob número 65121/2013 e pelo Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) sob número 03333112-0-0000-0096.

RESULTADOS

No período de março a junho de 2013, um total de 100 mães participaram com a doação de seu LH. Quanto às características das doadoras das amostras, em relação à idade cronológica, observou-se média de 28 ± 5 anos (16 a 43 anos) com 8% de 16 a 19 anos, 73% de 20 a 35 anos, 15% de 36 a 39 anos e apenas 4% com 40 ou mais anos de idade (Tabela 1). Para doadoras das amostras que tiveram parto a termo, a média foi de $24,9 \pm 4,6$ anos e para as de parto prematuro, a média de idade foi de $30,9 \pm 6,8$ anos.

Quanto à idade gestacional (IG) ao nascimento, 51% das doadoras tiveram parto prematuro com média de $33 \pm 3,1$ semanas (24 a 36) e 49% delas com parto a termo, a média foi de $38,1 \pm 1,3$ semanas (37 a 41).

Na análise da AD (Gráfico 1) para o LHF, observaram-se 93% das amostras com valores de AD original menor do que 4ºD e 7% com valores de acidez entre 4 e 5,6ºD. Para o LHR observou-se 81% das amostras com valores de AD inferior a 4ºD e 19% com valores entre 4 e 6ºD. Na análise do LHC observou-se 82% das amostras com AD inferior a 4ºD e 18% entre 4 e 6ºD.

Na análise do VC em Kcal/100mL (Gráfico 2), para o LHF observou-se 63% das amostras com VC inferior a 59,0; 23% de 59,0 a 69,9 e 14% apresentaram valor igual ou superiores que 70Kcal/100mL de LH. No LHR observou-se 67% das amostras com VC inferior a 59,0; 20% com valores de 59,0 a 69,9; e 13% apresentaram valores iguais ou superiores que 70Kcal/100mL. No LHC observou-se 65% das amostras com VC inferiores a 59,0; 25% com valor de 59,0 a 69,9; e 10% apresentaram valores iguais ou superiores a 70Kcal/100mL.

Quanto às características das amostras de LH (Tabela 1), observaram-se as seguintes médias: acidez do LHF $2,8 \pm 0,9^\circ\text{D}$; acidez do LHR e do LHC de $3,1 \pm 0,9^\circ\text{D}$; VC do LHF $56,5 \pm 15,8$ kcal/100mL; VC do LHR $55,8 \pm 14,1$ kcal/100mL e VC do LHC $55,9 \pm 14,2$ kcal/100mL.

Quanto à amplitude dos VC nas amostras do LHF, observou-se o limite inferior de 39,0 Kcal/100mL e o superior de 124,1 Kcal/100mL. Para o LHR e LHC o limite inferior foi de aproximadamente 39 Kcal/100mL e superior de 116 Kcal/100mL (Tabela 1).

As amostras de LHC foram analisadas também de acordo com o tempo de nascimento (Tabelas 2, 3,4) e organizadas em três grupos: dois grupos pelo tempo de nascimento, grupo Termo (49 amostras), grupo Prematuro (51 amostras) e o grupo Global reunindo o total das 100 amostras.

Quanto à análise da AD para o grupo global, observou-se média de $2,8 \pm 0,9$ para o LHF e de $3,1 \pm 0,9$ para o LHR e LHC. Houve diferença significativa entre o LHF em relação aos outros dois tempos e modos de estocagem, LHR e LHC, enquanto entre estes dois últimos a diferença não foi significativa (Tabela 2).

Quanto à análise da AD para o grupo termo, observou-se uma média de $2,6 \pm 0,8$ para o LHF, de $3,0 \pm 0,9$ para o LHR e de $2,9 \pm 0,9$ para o LHC. Houve diferença significativa apenas entre LHF e LHR (Tabela 2).

Quanto à análise da AD para o bloco prematuro, observou-se média de $3,0 \pm 0,8$ para o LHF, de $3,2 \pm 0,8$ para o LHR e de $3,2 \pm 0,9$ para o LHC. Houve diferença estatisticamente significativa entre o LHF em relação aos outros dois tempos e

modos de estocagem, LHR e LHC, enquanto entre estes dois blocos não houve diferença estatisticamente significativa (Tabela 2).

Na comparação do resultado das médias de AD nos três tempos e modos de estocagem, foi observada diferença significativa no LHF ($p=0,003$) para as médias entre os dois blocos Termo e Prematuro. Com relação ao VC não foi observada diferença significativa em qualquer análise entre os três modos e tempos de estocagem (Tabela 3) e entre os dois grupos termo e prematuro (Tabela 4).

Quanto ao resultado da análise de correlação entre as variáveis AD e VC observou-se que todas as correlações foram fracas e significativas (Tabela 5).

No LHF, a análise das amostras do LH no grupo global mostrou uma relação fraca entre a AD e VC ($r=0,2886$; $p\text{-valor}=0,0036$). Nas amostras do grupo prematuro a relação entre AD e VC do LH também foi fraca ($r=0,2984$; $p\text{-valor}=0,0334$). E quanto ao grupo termo, embora a relação foi fraca, apresentou a maior intensidade das correlações observadas nos três blocos no LHF ($r=0,4133$; $p\text{-valor}=0,0031$).

No LHR, a análise das amostras do LH no grupo global mostrou uma relação fraca entre AD e VC ($r=0,4287$; $p\text{-valor}<0,0001$). Nas amostras do bloco prematuro, a relação entre AD e VC do LH também foi fraca e significativa ($r=0,4263$, $p\text{-valor}=0,0018$). No grupo Termo esta relação foi moderada e significativa ($r=0,5255$; $p\text{-valor}=0,0001$).

No LHC, a análise das amostras do LH no grupo global mostrou que existe uma relação fraca entre a variação da AD e do VC ($r=0,4357$; $p\text{-valor}<0,0001$). Esta relação é mais forte no LHC quando comparado ao grupo global no LHF e LHR. No grupo termo, a relação entre a AD e VC do LH também mostrou-se fraca ($r=0,4595$; $p=0,0009$) semelhante ao resultado no grupo Prematuro ($r=0,4396$; $p\text{-valor}=0,0012$).

DISCUSSÃO

Na Unidade de Neonatologia internam tanto RNPT como de parto a termo pelas mais diversas causas. Quando estas crianças estão impossibilitadas de sugar, o LME pode ser ordenhado e oferecido ao RN via sonda ou copo. O cuidado no manejo com o LHOC deve ser rigoroso, não pode ser considerado um procedimento casual, aleatório, mas um trabalho competente tecnicamente e direcionado por protocolos de fluxo desde a coleta até o momento do consumo. Deve-se considerar que os receptores são crianças frágeis e com imunidade imatura.

Diversos estudos sobre avaliação da qualidade de LHOC e pasteurizado em BLH são disponíveis na literatura, entretanto ainda existe carência de pesquisas com manejo, valendo-se de amostras de LHOC exclusivo de mães com RN internados numa Unidade de Neonatologia. Assim esta pesquisa buscou analisar o efeito dos diferentes modos e tempos de estocagem sobre a AD e VC do LHOC de mães com RN internados, que vieram por livre demanda ao BLH do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

A análise das amostras no LHF apresentou 93% do valores de AD $<4^{\circ}\text{D}$ e 7% de ≥ 4 a $4,4^{\circ}\text{D}$ e representam a característica do LH imediatamente após a ordenha, ou seja, os seus valores originais. Segundo Manual da Agência Nacional de Vigilância Sanitária¹⁹ a AD original do LH se encontra entre 1 e 4°D ; já para Luzeau; Barróis e Odievre³⁴ estes valores estão entre 3 e 6°D . Logo após a ordenha podem ocorrer variações, sendo considerado bom para consumo, até 8 graus *Dornic*^{19,24,35,36,37,38}. Um estudo³⁹ realizado também com amostras de LHOC analisados imediatamente após a ordenha (LHF) de 19 nutrízes, mostrou variação da AD de 3,5 a $10,5^{\circ}\text{D}$ ($5,6 \pm 1,0^{\circ}\text{D}$). Esta variação entre as amostras das diferentes doadoras nos valores de AD no LHF, explica-se pela influência de componentes do próprio LH que variam de mulher para mulher. Entre eles citam-se os sais minerais, os citratos, fosfatos e proteínas⁴⁰ e pela atividade mais intensa da lipoproteína lípase, que ocorre no LH das mulheres com produção abundante, como as doadoras que possuem leite excedente às necessidades de seu filho³⁴.

Rona *et al.*⁴¹ analisaram o efeito do tempo e temperatura de estocagem de 37 amostras de LHOC em três condições: grupo 1, coletadas e imediatamente congeladas; grupo 2, amostras que permaneceram quatro horas à temperatura ambiente (25°C a 28°C) e após foram congeladas; grupo 3, amostras que permaneceram 24 horas sob refrigeração (6°C a 8°C) seguidas de congelamento. Os resultados revelaram grande variação da AD entre as amostras do grupo quatro horas e do grupo 24 horas, com coeficiente de variação $>50\%$, o que não aconteceu no grupo 1, com coeficiente de variação de 27%, e valores de AD entre 1 e $4,3^{\circ}\text{D}$, semelhante à presente pesquisa. Os autores atribuíram a grande variação da AD no grupo 2 e 3 ao crescimento de diferentes microrganismos psicotróficos (crescem em temperaturas $<7^{\circ}\text{C}$) fermentadores da lactose. Concluíram que há necessidade de congelar o LHOC imediatamente após a sua ordenha.

Estudos conduzidos na análise de acidez do LH, tem encontrado amplo alcance de valores para AD no LHOC doado a BLH, entretanto, a maioria deles com amostras de LH de doadoras externas, coletado em domicílio pelas próprias doadoras e analisado após a estocagem sob congelamento. Entre eles, um estudo⁴² analisou 909 amostras de 195 doadoras de LH doado a um BLH, em Brasília e encontrou 99,2% com valores $<8^{\circ}\text{D}$, variando de 2 a 8°D e média de $4,8 \pm 1,4^{\circ}\text{D}$. Diferente da presente pesquisa, na qual a coleta ocorreu em sala interna do BLH, sob supervisão e acompanhamento, e, pelos resultados obtidos na AD (93%, $<4^{\circ}\text{D}$), pode-se inferir a importância do ambiente adequado, que não favoreça o crescimento da microbiota produtora de ácido láctico, como também a importância do preparo da doadora de LH, especialmente quando será administrado cru ao próprio filho prematuro.

Sousa e Silva⁴³ em análise de 20 amostras de LH coletadas em um BLH de referência encontraram média de $2,83 \pm 2,36^{\circ}\text{D}$ para AD no LHF e média de $7,91 \pm 3,93^{\circ}\text{D}$ nas mesmas amostras após o congelamento. O resultado foi semelhante à média observada nesta pesquisa para o LHF ($2,8 \pm 0,9^{\circ}\text{D}$), entretanto quando comparadas às amostras de LHC, observou-se diferença ($3,1 \pm 0,9^{\circ}\text{D}$). Os autores explicaram o fato citando Cavalcante *et al*³⁷: ‘a temperatura atua como modificador da acidez titulável, podendo variar de 8 a 13°D ou mais’. Silva e Oliveira⁴⁴ também compararam a AD entre amostras de LH ordenhado em BLH e de LH em domicílio. Para as 33 amostras de LH ordenhado na sala de coleta de um BLH, 81,8% apresentaram valores $<4^{\circ}\text{D}$ e 18,2% entre 4 e 8°D . Para as 963 amostras de LH ordenhado em domicílio, 67,3% apresentaram AD $<4^{\circ}\text{D}$, 31,2% entre 4 e 8°D e 1,6% acima deste valor. Estes resultados também sugerem a importância do ambiente adequado, reservado e a supervisão no manejo com o LHOC. A AD sofre alteração devido à contaminação microbiana, mas também, depende da presença de ácidos graxos livres no LH, devido a lipólise que pode ser provocada por congelamento e descongelamento não adequados^{34,37,45,46,47,48}.

Na presente pesquisa, tanto após a refrigeração por 12 horas (LHR), como após congelamento por 15 dias (LHC), nenhuma amostra de LHOC apresentou valor igual ou acima de 8°D e o valor mais elevado foi de 5,6 no LHR e de 4,7 no LHC. A legislação brasileira vigente¹⁹, considerada uma das normas mais rigorosas no mundo, quanto ao valor de AD do LHOC, recomenda a sua administração somente quando a AD for $\leq 8^{\circ}\text{D}$ ^{24,35,36,37,38}. Valores acima deste apresentam risco para

desestabilização de proteínas solúveis e micelas de caseína, redução do teor de creme, da gordura total, do valor calórico, promoção da coagulação do LH, alteração do odor, redução dos fatores de proteção e podem levar à acidose ou alcalose metabólica e enterocolite necrozante^{46,48,49}. O LH mais adequado para o RNPT, é o que apresenta valor de AD $\leq 8^{\circ}\text{D}$, pois indica menor alteração na sua composição, melhor aproveitamento do cálcio e fósforo e menor risco de presença de micro-organismos^{19,35,,50}. Autores classificaram como de qualidade superior o LH com AD inferior a 4°D , de qualidade intermediária, de 4 a 7°D e imprópria para uso, o LH com AD igual ou acima de 8°D ⁵¹.

A refrigeração e o congelamento não eliminam micro-organismos patogênicos, mas inibem seu crescimento, bem a velocidade das reações químicas e enzimáticas que alteram a AD do LH sendo primordial a manutenção da cadeia de frio^{52,53}. A temperatura elevada favorece a proliferação e ação de bactérias patogênicas e de suas respectivas enzimas³⁷.

Os resultados da AD do LHOC nos três modos e tempos de estocagem obtidos nesta pesquisa podem ser explicados devido ao rigor no manejo com a coleta das amostras, ao uso de recursos para evitar ações que elevam a acidez do LHOC, como aos cuidados rigorosos de higiene pessoal, à utilização de materiais estéreis, o rápido e adequado processo de estocagem, resfriamento e congelamento do LH^{53,54,55,56}.

A variação dos valores de AD após a refrigeração por 12 horas e após congelamento por 15 dias, embora foi estatisticamente significativa, em termos biológicos, manteve todos valores próximos aos valores da acidez original para LH (1 a 4°D) e inferiores ao limite para descarte (8°D). E em termos práticos estes resultados estão segundo as Normas da ANVISA (2008) e da REDEBLH possibilitando que o LH seja administrado aos RNPT.

Quanto ao valor calórico do LH salienta-se que sua composição é dinâmica⁷, e os lipídios são os componentes mais variáveis e o substrato que fornece a principal fração de energia do LH. O índice calórico do LH depende desta variação^{7,29,30,31,57,58,59}. Na literatura não há uma definição exata para os limites que classificam o LH como hipocalórico ou normocalórico. Para alguns autores é hipocalórico o LH que apresenta valor menor que 50,0 Kcal/100mL de leite⁵⁶; para outros, quando abaixo de 58,0 Kcal/100mL⁶⁰. Já para o LH hipercalórico encontram-

se citações com limite para valores iguais ou superiores a 70,0 Kcal/100mL ou a partir de 71 Kcal/100mL de leite^{56,60,61,62,63}.

Para o LHF, nesta pesquisa, 63% das amostras de LH apresentaram VC <59,0 Kcal/100mL e 14% das amostras com VC >70 Kcal/100mL. Após refrigeração, 67% com valores \leq 59,0 Kcal/100mL e 13% com VC > 70Kcal/100mL. Após o congelamento, 65% das amostras apresentaram <59Kcal/100mL e 10% com >70 Kcal/100m. Os valores das médias de VC entre os três grupos, global, termo e prematuro, apresentaram diferença não estatisticamente significativa.(p=0,1015; 0,1364; 0,2930) (Gráfico 2; Tabela 2). Estudo com 30.846 amostras após congelamento⁶⁰ em um BLH, entre 2006 e 2009, definiu como hipocalórico o LH com VC <58 Kcal/100mL e encontrou 53,5% das amostras nesta faixa. Os autores classificaram como LH hipercalórico, os valores >71Kcal/100mL, representando 8,3% das amostras do seu estudo.

A modulação lipídica está diretamente ligada ao VC do LH, e sofre influência do período do dia em que o leite é ordenhado, do volume de leite retirado da mama, se antes ou após a mamada, do estágio da lactação (leite prematuro, colostro, transição e maduro), e da idade gestacional⁶⁴. Existem diferenças no leite de uma mesma mulher dentro das 24 horas do dia. Autores apontam diferenças entre as mulheres de forma geral e durante a mamada dependendo do volume retirado e tempo de duração desta, ou do tempo de ordenha do leite, principalmente devido à variação dos lipídios. São citadas ainda a individualidade genética, nutrição materna, estilo de vida e grupos étnicos^{57,58,65,66,67,68,69,70}. A amplitude e as diferenças no VC das amostras de LHO no LHF observados nesta pesquisa podem ser explicadas também porque 51% foram de leite prematuro de diferentes idades gestacionais (24 a 36) e 49% de leite a termo e diferentes fases de maturidade (colostro, leite de transição e leite maduro). Na literatura encontram-se valores variados nas médias do VC. Conforme o estágio de lactação, para o colostro a média é de 30,0 Kcal/100mL, para o leite de transição de 50,0 a 60,0 Kcal/100mL e para o leite maduro de 70,0 Kcal/100mL⁷¹. Para outro autor⁷² o valor calórico do colostro oscila em torno de 58 Kcal/100mL e no leite maduro em torno de 71 Kcal/100 mL. Conforme o tempo de ordenha da mama: o leite anterior com média de 46,4 a 70,0Kcal/100mL e leite posterior de 72,0 a 110,0 Kcal/100mL aproximadamente. Comparando-se com os valores calóricos da presente pesquisa, para o grupo total das 100 amostras a média foi de 56,5 \pm 15,8Kcal/100ml; para as amostras de leite de Termo foi de 58,3 \pm 14,8 e para

amostras de leite prematuro, $54,8 \pm 16,6$ Kcal/100ml e amplitude de 39 a 124,1 Kcal/100mL em 30 mL de LH ordenhado por amostra.

Pode também ter influenciado nos valores calóricos encontrados nesta pesquisa, o fato de que todas amostras foram coletadas no período da manhã, entre 08:00 e 12:30 horas, sempre os primeiros 30 ml de LHOC, descartando-se apenas algumas gotas, conforme exigência para manutenção da sua qualidade. A composição proteico-calórica do LH modifica-se com o passar das semanas especialmente no leite prematuro, no qual a concentração total de proteínas diminui no decorrer do primeiro mês enquanto a gordura aumenta gradualmente. O colostro apresenta conteúdo lipídico menor em relação ao leite de transição, leite maduro e ao leite posterior.^{6,7,18,27,41,73}

A análise de correlação de Spearmann para os valores entre AD e VC nos três diferentes modos e tempos de estocagem mostrou fraca correlação, embora estatisticamente significativa e mais intensa no LHR e LHC do que no LHF. Um estudo⁴¹ de correlação da AD com vários componentes do LH, revelou fraca correlação entre as variáveis AD e a proteína do LH em três condições diferentes de estocagem, bem como entre AD e cálcio ($p > 0,05$). Quanto à gordura, que define o VC do LH, houve diferença significativa dos seus valores somente entre o LHF e após 24 horas refrigerado. A alteração da AD não teve influência significativa sobre a concentração de nutrientes, semelhante ao resultado da presente pesquisa, na qual a variação entre AD e VC foi significativa, no entanto de intensidade fraca nos três tempos e modos de estocagem.

Outro estudo³⁷ em um BLH, com 66 amostras de LHOC selecionadas propositalmente por terem apresentado $AD > 7^\circ D$, foram descongeladas e analisadas (teste 1) quanto ao teor de creme, gordura total e VC, e recongeladas por 15 dias e novamente analisadas (teste 2). Foi observada redução com diferença significativa dos valores de creme, gordura total e valor calórico entre os dois testes, sendo que a média do VC diminuiu de 71,6 Kcal/100mL no teste 1 para 66,6 Kcal/100mL no teste 2. Os autores explicaram o fenômeno como resultado da possível influência da AD elevada ($> 7^\circ D$) devido à lipólise do LH, com efeito sobre o VC.

Na presente pesquisa houve variação da AD e do VC (de $2,8 \pm 0,8$ e $56,5 \pm 15,8$ no LHF; de $3,1 \pm 0,9$ e $55,8 \pm 14,1$ no LHR; e de $3,1 \pm 0,9$ e $55,9 \pm 14,2$ no LHC respectivamente) revelando aumento no valor das médias de AD e diminuição nas médias do VC na análise das amostras, a partir do LHF para as amostras no LHR e

LHC. Entretanto a correlação mostrou ser fraca e significativa para todos as amostras no grupo Global (total de 100 amostras) como também após a análise das amostras dos grupos em separado, conforme o tempo de parto (Prematuro e Termo).

Autores³⁴ concluiriam que AD do LH é mais sensível ao conteúdo total de solutos e pode estar diretamente relacionada ao conteúdo calórico, e que quanto maior o conteúdo de lipídios maior é o valor da acidez. Nesta pesquisa não se observou esta tendência na relação entre AD e VC.

Ericson, Gill e Chan (2013)⁴⁹ em 100 amostras de LH de mães de RNPT, e média de pH de $6,5 \pm 0,1$ (amostras controle), dividiram as amostras e acidificaram experimentalmente para $4,5 \pm 0,1$. Após congelamento a 4°C, observaram que nas amostras acidificadas experimentalmente, houve diminuição de 56% na atividade da lipase, de 14% na proteína total, mas aumento de 36% no valor do crematócrito (VC). Concluíram que há influência da alteração da AD sobre componentes do LH, porém, quanto ao achado destes autores sobre o aumento do VC relacionado ao aumento da AD, os dados obtidos na presente pesquisa não observaram o mesmo resultado..

Para as amostras do LHF no grupo Global a AD apresentou a média de $2,8 \pm 0,9$ e valor calórico de $56,5 \pm 15,8$; Quando as amostras foram separadas pelo tempo de parto, no grupo Termo, a AD apresentou o menor valor de acidez dos três grupos ($2,6 \pm 0,8$), entretanto o VC foi o mais elevado ($58,3 \pm 14,8$) dos três grupos. E no grupo Prematuro a média de AD foi a mais elevada dos três grupos ($3,0 \pm 0,8$), no entanto apresentou o menor VC ($54,8 \pm 16,6$) de todos. A mesma relação foi observada nos dois outros tempos e modos de estocagem (LHR e LHC).

Esta pesquisa revelou uma característica que merece ser salientada sobre a AD nas amostras de LH do grupo Prematuro, com resultado mais elevado de AD e menor VC em comparação ao grupo Termo. Sendo o grau de AD importante para o metabolismo e absorção de nutrientes do LH, particularmente pelo RNPT, e o VC para o ganho de peso tão necessário, mais pesquisas podem ser realizadas para comprovação e elucidação deste fenômeno e a sua influência na saúde destas crianças.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos para AD e VC revelaram que o LHC coletado sob as condições higiênico-sanitárias seguras e acompanhamento da doadora, apresentaram valores de AD e VC de acordo com a literatura, considerando o grau de maturidade, tempo de lactação e idade gestacional das doadoras das amostras de LH.

Os diferentes modos e tempos de estocagem, aos quais o LHOC foi submetido, mostraram efeitos no grau de AD com variação significativa estatisticamente, entretanto, todos valores se mantiveram dentro dos limites adequados para consumo, com margem de segurança superior a 2ºD. Para o VC, a variação não foi estatisticamente significativa entre os três modos e tempos de estocagem, e o LHR e LHC apresentaram resultados semelhantes. O LHOC, com adequado manejo, é um alimento seguro, de qualidade, e mantém os benefícios conhecidos pela literatura aos recém-nascidos internados em Unidade de Neonatologia.

Fonte de financiamento: Este projeto foi conduzido sem suportes financeiros de agências de fomento. A Universidade Federal do Parana forneceu apoio tecnico e de infra-estrutura.

Conflito de interesses: Nada a declarar

REFERÊNCIAS

- 1 Vinagre RD, Diniz EMA. O leite humano e sua importância na nutrição do recém-nascido prematuro. São Paulo: Atheneu; 2002.
- 2 Nascimento MBR, Issler H. Breastfeeding: making the difference in the development, health and nutrition of term and preterm newborns. *Rev Hosp Clin.* 2003;58(1):49-60.
- 3 Quintal VS, Diniz EM. Banco de leite humano. In: Feferbaum R, Falcão MC. *Nutrição do recém-nascido.* São Paulo: Atheneu; 2005. p.265-74.
- 4 Calil VLMY, Falcão MC. Composição do leite humano: o alimento ideal. *Rev Med.* 2003;82:1-10.
- 5 Ramos LA. Prematuridade: alimentação ideal para o prematuro. In: Issler H. *O aleitamento materno no contexto atual: políticas, práticas e bases científicas.* São Paulo: Sarvier; 2008. p.383.
- 6 Akre J. *Alimentação infantil: bases fisiológicas.* São Paulo: Instituto de Saúde/IBFAN; 1997.
- 7 Almeida JAG. *Amamentação: um híbrido natureza-cultura.* Rio de Janeiro: Fiocruz; 1999.
- 8 Giugliani ERJ. Aleitamento materno na prática clínica. *J Pediatr (Rio J)* 2000;76(Supl.3):s238-s52.
- 9 Koletzko B, Rodrigues-Palmero M, Demmelmaier H, Fidler N, Jensen R, Suaerwald T. Physiological aspects of human milk lipids. *Early Hum Dev.* 2001;65(2):3-18.
- 10 Rego JD. *Aleitamento materno.* São Paulo: Atheneu; 2002.
- 11 Diniz EMA, Costa MTZ. Amamentação do recém-nascido na unidade de cuidados intensivos. In: *Nutrição do Recém-nascido.* São Paulo: Atheneu; 2003. p.251-255.
- 12 Margotto PR. *Assistência ao recém-nascido de risco.* 2a ed. Brasília: Pórfiro; 2006.
- 13 Ribeiro LC, Kuzuhara JSW. Lactação. In: Silva SMCS, Mura JD'AP. *Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia.* São Paulo: Roca; 2007. p.293-318.
- 14 Toma TS, Rea MF. Benefícios da amamentação para a saúde da mulher e da criança: um ensaio sobre as evidências. *Cad Saúde Pública.* 2008;24(Supl 2):25-46.
- 15 Gutiérrez DB, Panchula J. ABM Protocolo clínico # 8: Almacenamiento de leche humana. Información para El uso casero em bebés a término. Revisión. *Medicina de La Lactancia Maternal.* 2010;5(3).

- 16 Agarwal S, Karmaus W, Davis S, Gangur V. Review: Imunne markus in breast milk and fetal and maternal body fluids: a systematic review of perinatal concentration. *J Hum Lact.* 2011;27(2):171-86.
- 17 Carvalho MR. Amamentando seu bebê prematuro. In: Aleitamento.com. 1.º site mundial de Aleitamento Materno em Português. 25 abr. 2011. Recebido via e-mail em 20/02/2014 [citado 21 fev 2014]. Disponível em: <http://www.aleitamento.com/mae-canguru/conteudo.asp?cod=691>
- 18 Silva FF. Qualidade do leite materno em banco de leite humano: aspectos microbiológicos, físico-químicos e perfil de aminos bioativas [dissertação]. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG; 2008. [citado 28 jun 2013]. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/>
- 19 Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Banco de Leite Humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos. Brasília: ANVISA; 2008.
- 20 Sucena PL, Furlan MFFM. Incidência da utilização de leite materno ordenhado em uma Unidade de Terapia Intensiva Neonatal e caracterização dos recém-nascidos. *Arq Ciência Saúde.* 2008;15(2):p.82-9.
- 21 Vinagre RD. O uso do leite humano procedente de banco de leite humano na alimentação do recém-nascido prematuro. São Paulo: Atheneu; 2001.
- 22 Carvalho MR, Tavares LAM. Amamentação: bases científicas. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.
- 23 Morley R, Lucas A. Randomized diet in the neonatal period and growth performance until 7,5-8 y of age in preterm children. *Am J Clin Nutr.* 2000;71:822-8.
- 24 Vieira AA, Moreira MEL, Rocha AD, Pimenta HP, Lucena SL. Análise do conteúdo energético do leite humano administrado a recém-nascidos de muito baixo peso ao nascimento. *JPediatr.* 2004;80(6):490-4.
- 25 Nascimento MBR, Issler H. Aleitamento materno em prematuros: manejo clínico hospitalar. *J Pediatr (Rio J)* 2004;80(Supl):sl63-172.
- 26 OMS/UNICEF. Iniciativa Hospital Amigo da Criança: revista, atualizada e ampliada para o cuidado integrado. Curso de 20 horas para equipes de maternidade. Módulo 3. Brasília: UNICEF; 2009.
- 27 Almeida H, Venancio SI, Sanches MT, Onuki D. The impact of kangaroo care on exclusive breastfeeding in low birth weight newborns. *J Pediatr (Rio J)* 2010;86(3):250-3.
- 28 Venâncio SI, Almeida H. Método mãe canguru: aplicação no Brasil, evidências científicas e impacto sobre o aleitamento materno. *J Pediatr.* 2004;80(5):173-80.
- 29 Lucas A, Gibbs JAH, Lyster RLJ, Baum JD. Creamatocrit: simple clinical technique for estimating fat concentration and energy value of human milk. *Br Med J.* 1978;1(6119):1018-20.

- 30 Wang CD, Chu PS, Mellen BS, Shenai JP. Creamatocrit and the nutrients composition of the human milk. *JPerinatol*. 1999;19(5):343-6.
- 31 Koletzko B, Rodrigues-Palmero M, Demmelmair H, Fidler N, Jensen R, Suaerwald T. Physiological aspects of human milk lipids. *Early Hum Dev*. 2001;65(2):3-18.
- 32 Tinoco SMB, Sichieri R, Moura AS, Santos FS, Carmo MGT. Importância dos ácidos graxos essenciais e os efeitos dos ácidos graxos *trans* do leite materno para o desenvolvimento fetal e neonatal. *Cad Saúde Pública*. 2007; 23(3):525-34.
- 33 Grazziotin AL, Grazziotin MCB, Letti LAJ. Descarte de leite humano doado a banco de Leite antes e após medidas para reduzir a quantidade de leite imprópria para consumo. *J Pediatr (Rio J.)* 2010;86(4).
- 34 Luzeau R, Barrois V, Odievre M. Acides gras non estérifiés et acidité titrable du lait maternel. *Arch Fr Pediatr*. 1983;6(40):449-51.
- 35 Silva VG. Normas técnicas para banco de leite humano: uma proposta para subsidiar a construção para boas práticas [tese]. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2004.
- 36 Guimarães V, Novak FR. Normas técnicas REDEBLH-BR para bancos de leite humano. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2005.
- 37 Cavalcante JLP, Telles FJS, Peixoto MMLV, Rodrigues RCB. Uso da acidez titulável no controle de qualidade do leite humano ordenhado. *Rev Ciênc Tecnol Aliment*. 2005;25(1):103-8.
- 38 REDEBLH. Portal de Rede brasileira de bancos de leite humano [citado 08 abr 2013]. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/redeblh>
- 39 Almeida JAG. Qualidade do leite humano coletado e processado em bancos de leite [dissertação]. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa (UFV); 1986. 84p.
- 40 Almeida JAG. Amamentação: repensando o paradigma. Rio de Janeiro: Fiocruz; 1998.
- 41 Rona MSS, Novak FR,; Portilho M,; Pelissari FM, Martins ABT,; Matioli G. Efeito do tempo e da temperatura de estocagem nas determinações de acidez, cálcio, fósforo, proteínas e lipídios de leite de doadoras de bancos de Leite Humano. *Rev Bras Saúde Mater infant*. 2008;8(3):257-63.
- 42 Almeida SG, Dorea JG. Quality control of banked Milk in Brasilia, Brazil. *J Hum Lact*. 2008;22(3):335-9.
- 43 Sousa PPR, Silva JA. Monitoramento da qualidade do leite humano ordenhado e distribuído em banco de leite de referência. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;69(1):7-14.

- 44 Silva TC, Oliveira C. Acidez e densidade calórica do leite humano ordenhado cru proveniente de doadoras externas e da sala de ordenha do Banco de Leite Humano de Dourados, MT. In: Anais do 5.º Congresso Brasileiro de Bancos de Leite Humano; 1.º Congresso Iberoamericano de BLH; Fórum de Cooperação Internacional em BLH/ ABC/FIOCRUZ; 2010. Brasília/DF, Brasil. Rio de Janeiro. 2010;(17):13.
- 45 Galhardo ANSM, Araujo WMC, Borgo LA. Acidez Dornic como parâmetro de qualidade em Bancos de Leite Humano. Hig Alim. 2002;16(100):16-27.
- 46 Cavalcante JLP, Telles FJ. Aspectos físicos-químicos do leite humano ordenhado cru e congelado. In: Anais do 3.º Congresso Brasileiro de Bancos de Leite Humano; 2002. Petrópolis,RJ: FIOCRUZ; 2002. p.43.
- 47 Bertino E, Giribaldi M, Baro C, Giancotti V, Pazzi M, Peila C, Tonetto P, Arslanoglu S, Moro GE, Cavallarin L, Gastaldi G. Effect of prolonged refrigeration on the lipid profile, lipase activity and oxidative status of human milk. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2013;56(4):390-6.
- 48 Novak FR, Cordeiro DMB. Correlação entre população de microorganismos mesófilos aeróbios e acidez Dornic no leite humano ordenhado. J Pediatr. 2007;83(1).
- 49 Erickson T, Gill G, Chan G M. The effects of acidification on human milk's cellular and nutritional content. J Perinatol. 2013;33(5):371-3.
- 50 Almeida.JA, Novak, FR, Sandoval, MH. Recomendaciones técnicas para los bancos de leche humana II: control de calidad. Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría,Caracas, v. 61, n.1, p.12-15, enero/marzo, 1998.
- 51 Vasquez-Roman S, Garcia-Lara NR, Escuder-Vieco D, Chaves-Sanchez F, Cruz-Bertolo J, De la, Pallas-Alonso, CR. Determinação of dornic acidity as a method to select donor milk in a milk bank. Breastfeed Med. 2013;8(1):99-104.
- 52 Borgo LA. Efeitos da pasteurização e do congelamento sobre a fração lipídica do leite humano [tese]. Brasília: Faculdade de Ciências da Saúde. UNB; 2011. p.125.
- 53 Aprile MM, Feferbaum R. Banco de leite humano e prematuridade. In: Aprile, MM, Feferbaum R. Banco de Leite Humano. São Paulo: Atheneu; 2011.
- 54 Covas MC, Alda E, Baeza A, Ferrer L, Fernandez C. Almacenamiento de leche humana su influencia en la composicion química y desarrollo bacteriano en três momentos de La lactancia. Arch Argent Pediatr. 2000;98(2):92-8.
- 55 Heck AR. Controle de qualidade da coleta à distribuição. In: Anais do Congresso Brasileiro de BLH; 2002. Ribeirão Preto, SP; 2002.
- 56 Mattar MJG, Quintal VS. Banco de Leite Humano. In: Issler H. O aleitamento materno no contexto atual: políticas, prática e bases científicas. São Paulo: Sarvier; 2008. Cap. 12.

- 57 Gross SJ. Growth and biochemical response of preterm infants fed human Milk or modified infant formula. *N Engl J Med*. 1983;308(5):237-41.
- 58 Jensen RG. Lipids in human milk. *Lipids*. 1999;34(12):1243-71.
- 59 Schanler RJ. The use of human Milk for premature infants. *Pediatr Clin North Am*. 2001;48(1):207-19.
- 60 Moraes OS, Oliveira MMB, Dalmas JC. Perfil calórico do leite pasteurizado no banco de leite humano de um hospital escola. *Rev Paul Pediatr* [Internet]. 2013 [citado 15 jul 2014]; 31(1). Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-05822013000100008
- 61 Aprile MM. Crescimento de recém-nascidos de muito baixo peso alimentados com leite de banco de leite humano selecionado segundo valor calórico e protéico [dissertação]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2006.
- 62 Panichi MN, Stancari RCA, Suaiden MAG, Gimenes NO. Controle da qualidade do leite humano ordenhado processado no banco de leite humano de Bauru, SP/Brasil. In: *Anais do 5.º Congresso Brasileiro de BLH*; 2010. [Internet]. Brasília. 2010;203:162. [citado 02 jun 2014]. Disponível em: <http://www.redeblh.fiocruz.br/media/trconblh10.pdf>
- 63 Oliveira MMB, Dalmas JC. Perfil calórico do leite humano pasteurizado no banco de leite humano do hospital universitário de Londrina. In: *Anais do 5.º Congresso Brasileiro de BLH*; 2010. [Internet]. Brasília. 2010;172:138. [citado 02 jun 2014]. Disponível em: <http://www.redeblh.fiocruz.br/media/trconblh10.pdf>
- 64 Marin CM, Sanjurjo AL, Sager G, Margheritus C, Alaniz MJT. Composición en ácidos grasos de leche de madres de recién nacidos de pretérmino y de término. *Arch Argent Pediatr*. 2009;107(4):315-20.
- 65 Valdés V, Sánchez AP, LabbOCK M. Manejo clínico da lactação. assistência à nutriz e ao lactente. Rio de Janeiro: Revinter; 1996. 128p.
- 66 Picciano MF. Nutrient composition of human milk. *Pediatr Clin North Am*. 2001;48(1):53-67.
- 67 Yamawaki N, Yamada M, Kan-No T, Kojima T, Kanedo T, Yonekudo A. Macronutrient, mineral and trace element composition of breast milk from Japanese women. *J Trace Elem Med Biol*. 2005;9(2):171-81.
- 68 Heiman H, Schanler RJ. Benefits of maternal and donor human milk for premature infants. *Early Hum Dev*. 2006;82(12):781-7.
- 69 Severine NA, Nóbrega FJ, Juliano Y, Novo NF. Medida de energia total do leite materno de mães de trigêmeos, gêmeos e filhos únicos. *Rev Paul Pediatr*. 2008;26(2).
- 70 Costa AGV, Sabarense C M. Modulação e composição de ácidos graxos do leite humano. *Rev Nutr*. 2010;23(3):445-57.

- 71 Menconi SD. Banco de leite humano. In: Carvalho MR, Tavares LAM. Amamentação: bases científicas. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010. Cap. 4. p.64-81.
- 72 Lamounier JÁ, Leão E. Nutrição na infância. In: Oliveira JED, Marchini J. Ciências nutricionais. São Paulo: Sarvier; 2008. p.216-237.
- 73 Feferbaum R, Quintal VS, Araujo MCK. Nutrição enteral do recém-nascido de muito baixo peso. In: Feferbaum R.; Falcão M. C. Nutrição do recém-nascido. São Paulo: Atheneu; 2003. p.315-328.

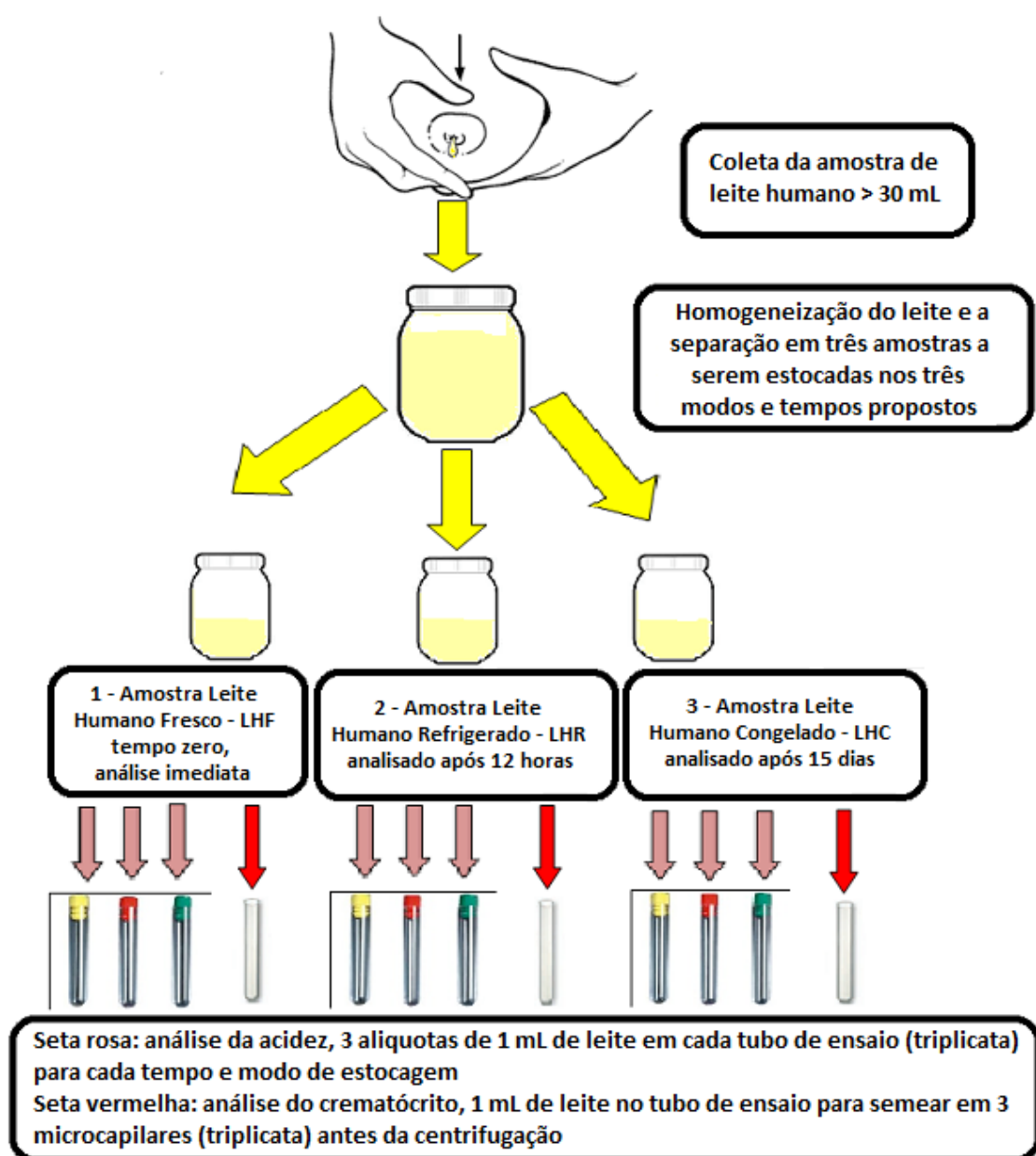


Figura 1. Metodologia adotada no estudo.

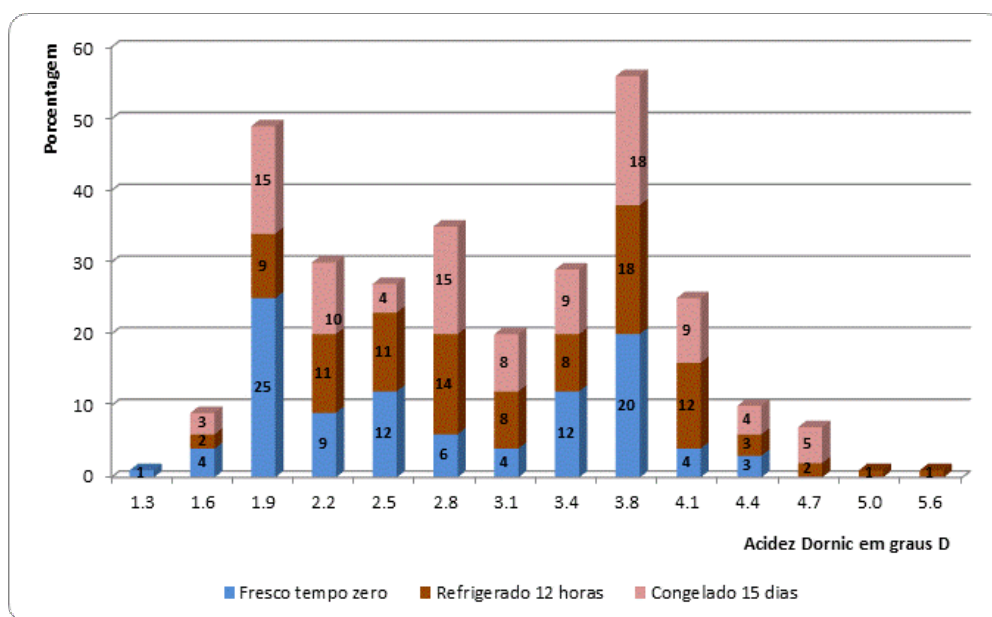


Gráfico 1. Distribuição da frequência dos valores da acidez *Dornic* do LHC de acordo com os tempos e modos de estocagem

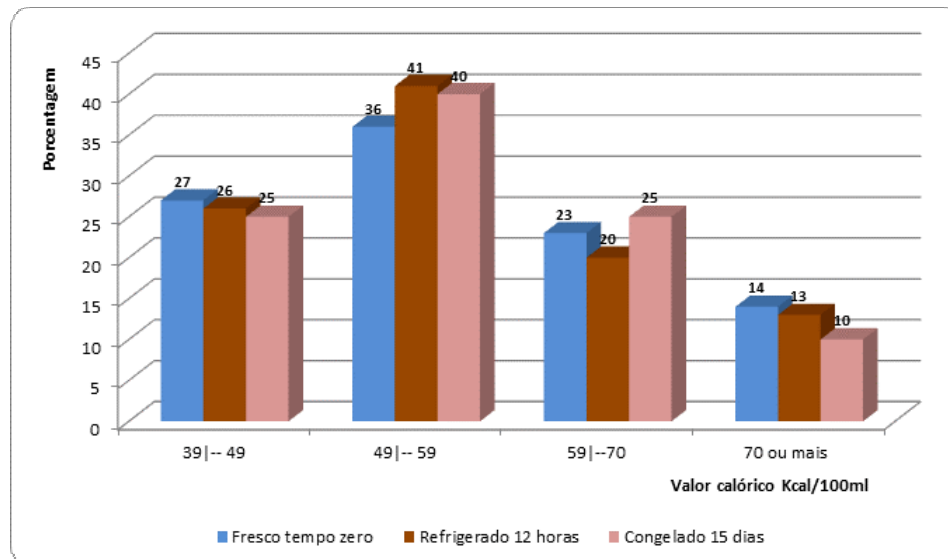


Gráfico 2. Distribuição da frequência do valor calórico do LHC de acordo com os tempos e modos de estocagem – BLH-HC-UFPR

Tabela 1 - Acidez Dornic e Crematócrito segundo o menor valor observado (min) e maior valor observado (max), media (x) e desvio-padrão (s)

CARACTERÍSTICA	N	Min.	Max.	\bar{x}	Desvio Padrão
AD fresco ($^{\circ}$ D)	100	1.3	4.4	2.8	0.9
AD refrigerado ($^{\circ}$ D)	100	1.6	5.6	3.1	0.9
AD congelado ($^{\circ}$ D)	100	1.6	4.7	3.1	0.9
VC fresco (kcal/100ml)	100	39	124.1	56.5	15.8
VC refrigerado (kcal/100ml)	100	39	116.6	55.8	14.1
VC congelado (kcal/100ml)	100	39.2	116.1	55.9	14.2

Nota: AD - acidez *Dornic*; VC - valor calórico.

Tabela 2 - Distribuição de todas as amostras de LHOC e das relativas ao tempo de nascimento segundo a acidez e valor calórico

Variável	Global		Termo		Prematuro		p-Valor ⁽¹⁾
	n	Média \pm DP	n	Média \pm DP	n	Média \pm DP	
AD fresco	100	2.8 \pm 0.9 a	49	2.6 \pm 0.8 a	51	3.0 \pm 0.8 a	0.0030
AD 12h	100	3.1 \pm 0.9 b	49	3.0 \pm 0.9 b	51	3.2 \pm 0.8 b	0.2790
AD15 dias	100	3.1 \pm 0.9 b	49	2.9 \pm 0.9 a b	51	3.2 \pm 0.9 b	0.0473
VC fresco	100	56.5 \pm 15.8 a	49	58.3 \pm 14.8 a	51	54.8 \pm 16.6 a	0.1015
VC 12h	100	55.8 \pm 14.1 a	49	57.2 \pm 13.0 a	51	54.4 \pm 15.1 a	0.1364
VC15 dias	100	55.9 \pm 14.2 a	49	57.2 \pm 13.9 a	51	54.6 \pm 14.5 a	0.2930

Nota: Teste T de amostras independentes. ANOVA pelo FRIEDMAN (amostras pareadas, mesmo leite em diferentes momentos).

(1) P-valor referente ao teste Manny-Whitney comparando os grupos Termo e Prematuro.

(2) Médias sob a mesma letra indica diferença não significativa pelo teste de Friedman.

Tabela 3 - Coeficiente de correlação de Spearmann para valores de acidez Dornic e valor calórico nos diferentes modos e tempos de armazenamento

	Global	Termo	Prematuro
AD fresco x VC fresco	r = 0.2886 (p-valor = 0.0036)	r = 0.4133 (p-valor = 0.0031)	r = 0.2984 (p-valor = 0.0334)
AD refrigerado x VC refrigerado	r = 0.4287 (p-valor < 0.0001)	r = 0.5255 (p-valor = 0.0001)	r = 0.4263 (p-valor = 0.0018)
AD congelado x VC congelado	r = 0.4357 (p-valor < 0.0001)	r = 0.4595 (p-valor = 0.0009)	r = 0.4396 (p-valor = 0.0012)

APÊNDICE
INSTRUMENTOS DE REGISTRO DAS ANÁLISES DAS AMOSTRAS DE LEITE

AMOSTRA DE LEITE FRESCO Folha n.º 1**//// ACIDEZ DORNIC ///****CREMATÓCRITO**

Amostra	Data coleta e 1.ª análise	IG	Tempo de Lactação	Acidez de cada alíquota			Media AD	Coluna total (cm)			Medida de creme (cm)			Valor calórico de cada alíquota			Media Kcal/100ml
1F0																	
2F0																	
3F0																	
4F0																	
5F0																	
6F0																	
7F0																	
8F0																	
9F0																	
10F0																	
11F0																	
12F0																	
13F0																	
14F0																	
15F0																	
16F0																	
17F0																	
18F0																	
19F0																	
20F0																	

Responsável _____



//// ACIDEZ DORNIC ////

CREMATÓCRITO

Amostra	Data coleta e 1.ª análise	IG	Tempo de Lactação	Acidez de cada alíquota			Media AD	Coluna total (cm)			Medida de creme (cm)			Valor calórico de cada alíquota		Media Kcal/100ml
1R12h																
2R12h																
3R12h																
4R12h																
5R12h																
6R12h																
7R12h																
8R12h																
9R12h																
10R12h																
11R12h																
12R12h																
13R12h																
14R12h																
15R12h																
16R12h																
17R12h																
18R12h																
19R12h																
20R12h																

Responsável _____

AMOSTRA DE LEITE CONGELADO POR 15 DIAS Folha n.º 1**//// ACIDEZ DORNIC ////****CREMATÓCRITO**

Amostra	Data coleta e 1.ª análise	IG	Tempo de Lactação	Acidez de cada alíquota			Media AD	Coluna total (cm)			Medida de creme (cm)			Valor calórico de cada alíquota			Media Kcal/100ml
1C15d																	
2C15d																	
3C15d																	
4C15d																	
5C15d																	
6C15d																	
7C15d																	
8C15d																	
9C15d																	
10C15d																	
11C15d																	
12C15d																	
13C15d																	
14C15d																	
15C15d																	
16C15d																	
17C15d																	
18C15d																	
19C15d																	
20C15d																	

Responsável _____



Amostra Número	IG ao Parto (semanas)	Tempo Lactação (dias)	Idade da doadora (anos)	LEITE FRESCO Análise no momento imediato após coleta		LEITE REFRIGERADO Análises após 12 HORAS		LEITE CONGELADO Análise após 15 DIAS		AD = acidez Dornic – VC: valor calórico / 100ml Fator da Soda: _____
				AD	VC	AD	VC	AD	VC	
1										
2										
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
10										
11										
12										
13										
14										
15										
16										
17										
18										
19										
20										

Responsável _____



Amostra Número	Idade Gestacional ao Parto (semanas)	Tempo Lactação (dias)	Idade da doadora (anos)	LEITE FRESCO Análise tempo Zero		LEITE REFRIGERADO Análises após 12 HORAS		LEITE CONGELADO Análise após 15 DIAS		AD: acidez Domic Fator da Soda: 0,94 VC: valor calórico / 100ml
				AD	VC	AD	VC	AD	VC	Considerando LHO Fresco
1	32	5	20	3,8	50,4	3,4	47,7	2,8	49,5	Hipocalórico
2	32	5	20	3,8	48,5	3,8	49,3	3,1	50,1	Hipocalórico
3	32	5	20	3,8	52,7	3,4	48,3	2,5	52,7	Hipocalórico
4	36	4	18	2,8	48,6	3,1	47,6	3,1	47,3	Hipocalórico
5	34	2	43	3,4	43,0	2,5	39,8	1,9	39,6	Hipocalórico
6	38	2	16	4,4	124,1	4,4	109,8	4,1	116,1	Hipercalórico
7	39	2	20	1,9	39,4	1,9	39,5	1,6	39,8	Hipocalórico
8	38	10	29	1,9	62,3	1,9	55,6	1,6	59,2	
9	39	2	20	2,2	80,1	2,2	75,0	1,6	80,1	Hipercalórico
10	38	16	33	1,9	68,1	1,9	61,0	1,9	62,4	
11	39	3	20	1,9	49,7	2,8	49,3	1,9	43,6	Hipocalórico
12	39	3	20	1,9	49,7	2,8	50,8	2,8	49,1	Hipocalórico
13	39	3	20	1,9	49,3	2,2	49,5	1,9	49,0	Hipocalórico
14	27	2	24	3,8	53,9	5,6	57,9	3,4	59,7	Hipocalórico
15	37	3	28	3,4	73,0	4,7	67,7	4,1	69,1	Hipercalórico
16	37	3	28	3,8	73,2	4,7	67,0	4,1	69,9	Hipercalórico
17	38	15	29	2,2	43,2	2,5	49,4	1,9	45,4	Hipocalórico
18	37	4	28	4,4	49,5	4,1	54,5	4,1	50,6	Hipocalórico
19	37	4	28	4,1	52,3	4,1	59,5	3,4	52,5	Hipocalórico
20	37	4	28	4,1	72,8	4,1	74,9	4,1	76,6	Hipercalórico



Amostra Número	Idade Gestacional ao Parto (semanas)	Tempo Lactação (dias)	Idade da doadora (anos)	LEITE FRESCO Análise tempo Zero		LEITE REFRIGERADO Análises após 12 HORAS		LEITE CONGELADO Análise após 15 DIAS		AD: acidez Domic Fator da Soda: 0,94 VC: valor calórico / 100ml
				AD	VC	AD	VC	AD	VC	Considerando LHO Fresco
21	37	4	34	2,2	48,9	2,8	50,5	3,1	49,1	Hipocalórico
22	37	4	18	1,9	49,4	2,2	49,1	1,9	48,5	Hipocalórico
23	37	4	18	1,9	48,7	2,2	48,9	2,2	49,0	Hipocalórico
24	38	16	29	1,3	39,4	1,9	39,1	1,9	39,6	Hipocalórico
25	38	17	29	1,9	46,8	1,9	49,3	1,9	48,9	Hipocalórico
26	38	17	29	1,9	48,8	1,9	49,9	1,9	49,5	Hipocalórico
27	38	17	29	1,9	59,5	1,9	48,7	1,9	50,0	
28	37	4	29	1,6	65,6	1,9	61,5	1,9	60,5	
29	37	4	29	1,6	60,2	2,5	56,3	1,9	58,9	
30	37	4	18	3,1	51,0	4,1	49,8	3,8	49,1	Hipocalórico
31	38	15	29	1,9	59,9	1,6	50,2	1,9	48,5	
32	38	15	29	2,5	56,6	1,6	49,4	2,2	49,4	Hipocalórico
33	38	3	24	1,9	49,1	3,1	50,1	3,8	51,4	Hipocalórico
34	38	3	24	1,9	49,0	3,1	49,3	3,8	49,8	Hipocalórico
35	38	3	24	1,9	49,5	3,1	48,3	3,1	50,8	Hipocalórico
36	39	10	26	1,9	69,3	3,4	71,9	3,8	69,5	
37	39	10	26	1,9	69,7	2,8	71,9	3,1	69,5	
38	36	5	33	3,1	40,0	3,4	42,1	3,4	39,8	Hipocalórico
39	36	5	33	3,1	39,0	3,4	39,0	3,4	43,1	Hipocalórico
40	36	5	33	2,8	39,7	3,1	43,3	2,2	46,9	Hipocalórico



Amostra Número	Idade Gestacional ao Parto (semanas)	Tempo Lactação (dias)	Idade da doadora (anos)	LEITE FRESCO Análise tempo Zero		LEITE REFRIGERADO Análises após 12 HORAS		LEITE CONGELADO Análise após 15 DIAS		AD: acidez Domic Fator da Soda: 0,94 VC: valor calórico / 100ml
				AD	VC	AD	VC	AD	VC	Considerando LHO Fresco
41	36	2	36	2,2	82,6	2,8	80,4	3,4	81,8	Hipercalórico
42	37	2	33	3,4	75,4	5,0	78,1	3,4	71,9	Hipercalórico
43	33	4	29	2,2	39,5	2,5	39,2	2,8	39,2	Hipocalórico
44	33	4	29	2,2	39,5	2,5	39,4	2,8	39,8	Hipocalórico
45	33	4	29	2,2	39,4	2,5	40,5	2,5	45,8	Hipocalórico
46	24	6	18	2,5	46,0	1,9	46,3	1,9	50,7	Hipocalórico
47	37	8	22	2,5	66,8	4,1	66,1	3,1	68,1	
48	37	8	22	2,5	64,7	3,8	64,2	3,1	66,6	
49	37	8	22	2,5	66,8	3,8	64,8	3,8	64,4	
50	37	8	22	2,5	66,7	3,8	67,3	4,1	69,7	
51	37	14	22	3,4	65,0	3,4	66,2	3,4	64,3	
52	37	14	22	3,4	63,3	3,1	64,4	3,1	66,6	
53	37	14	22	3,4	68,4	3,1	65,9	3,4	65,9	
54	37	14	22	3,4	68,8	3,4	66,4	3,8	67,7	
55	36	7	24	3,1	56,8	3,8	56,3	4,7	59,5	Hipocalórico
56	36	7	24	3,8	59,8	4,1	62,4	4,4	59,4	
57	36	7	24	3,8	50,7	4,1	53,1	4,7	51,8	Hipocalórico
58	36	7	24	4,4	70,1	4,4	69,1	4,7	69,1	Hipercalórico
59	36	7	24	3,8	73,1	4,4	73,7	4,7	75,9	Hipercalórico
60	36	7	24	3,8	90,6	4,1	85,1	4,7	91,0	Hipercalórico



Amostra Número	Idade Gestacional ao Parto (semanas)	Tempo Lactação (dias)	Idade da doadora (anos)	LEITE FRESCO Análise tempo Zero		LEITE REFRIGERADO Análises após 12 HORAS		LEITE CONGELADO Análise após 15 DIAS		AD: acidez Domic Fator da Soda: 0,94 VC: valor calórico / 100ml
				AD	VC	AD	VC	AD	VC	Considerando LHO Fresco
61	38	2	31	3,8	39,7	3,8	39,0	4,4	42,0	Hipocalórico
62	35	4	36	1,9	39,2	2,2	39,5	2,8	39,4	Hipocalórico
63	35	4	36	1,9	39,1	2,2	39,5	2,2	39,4	Hipocalórico
64	35	4	36	1,9	39,3	2,2	39,4	2,2	39,3	Hipocalórico
65	29	4	34	1,9	50,5	2,2	51,1	2,8	51,1	Hipocalórico
66	29	4	34	1,6	49,6	2,2	50,0	2,2	49,8	Hipocalórico
67	29	4	34	1,9	50,9	2,2	52,9	1,9	50,0	Hipocalórico
68	29	4	34	1,9	58,3	2,2	58,5	2,2	54,1	
69	29	4	34	1,6	62,3	2,5	63,1	2,2	62,0	
70	35	4	37	3,8	50,0	3,8	49,6	3,8	49,8	Hipocalórico
71	35	4	37	3,8	50,1	3,8	50,2	3,8	49,9	Hipocalórico
72	35	4	37	3,8	50,7	3,8	49,1	4,4	49,6	Hipocalórico
73	33	4	37	3,4	116,8	4,1	116,6	3,8	102,1	Hipercalórico
74	35	5	21	4,1	50,5	4,1	50,4	4,4	50,4	Hipocalórico
75	35	5	37	4,1	49,4	4,1	49,2	4,1	50,7	Hipocalórico
76	35	5	37	3,8	49,7	3,8	49,9	4,1	49,7	Hipocalórico
77	35	5	37	3,8	50,6	4,1	49,5	3,8	49,7	Hipocalórico
78	35	5	37	3,8	49,6	3,8	50,9	3,8	49,4	Hipocalórico
79	35	5	37	3,8	49,5	3,8	49,8	4,1	49,5	Hipocalórico
80	35	5	37	3,8	72,3	3,8	71,5	3,8	69,5	Hipercalórico



Amostra Número	Idade Gestacional ao Parto (semanas)	Tempo Lactação (dias)	Idade da doadora (anos)	LEITE FRESCO Análise tempo Zero		LEITE REFRIGERADO Análises após 12 HORAS		LEITE CONGELADO Análise após 15 DIAS		AD: acidez Domic Fator da Soda: 0,94 VC: valor calórico / 100ml
				AD	VC	AD	VC	AD	VC	Considerando LHO Fresco
81	35	5	37	3,8	69,1	3,8	69,3	3,8	69,3	
82	33	8	21	2,5	111,1	2,5	92,1	3,8	97,1	Hipercalórico
83	41	3	22	3,4	52,3	3,8	52,9	3,8	50,1	Hipocalórico
84	41	3	22	3,4	51,9	3,8	51,5	3,8	51,0	Hipocalórico
85	41	3	22	3,8	74,5	3,8	72,0	3,8	73,6	Hipercalórico
86	41	5	29	2,5	40,0	2,8	39,4	2,8	39,7	Hipocalórico
87	41	5	29	1,9	40,1	2,8	39,9	2,8	40,2	Hipocalórico
88	41	5	29	1,9	43,2	2,8	46,0	2,8	43,8	Hipocalórico
89	32	5	23	3,4	60,6	3,8	58,8	3,8	61,2	
90	32	5	23	3,4	61,0	3,4	59,1	3,4	61,8	
91	32	4	40	2,5	58,6	2,8	58,6	2,8	58,6	
92	32	4	40	2,5	59,0	2,8	60,5	2,8	55,6	
93	32	4	40	2,5	63,0	2,8	63,5	2,8	61,7	
94	32	4	31	2,5	39,8	2,5	40,2	2,8	39,6	Hipocalórico
95	32	4	31	2,2	39,6	2,5	40,2	2,2	39,6	Hipocalórico
96	32	4	31	2,2	40,2	2,5	40,2	2,2	39,8	Hipocalórico
97	25	4	30	2,8	50,0	3,1	50,1	2,8	50,6	Hipocalórico
98	38	5	19	2,8	50,1	2,8	50,6	2,5	50,2	Hipocalórico
99	38	6	19	2,8	50,9	2,8	50,9	2,5	50,6	Hipocalórico
100	25	14	30	2,3	52,3	2,8	52,9	2,8	52,3	Hipocalórico

Responsável _____

ANEXOS

**ANEXO 1 - PROJETO DE PESQUISA -
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**



HOSPITAL DE CLÍNICAS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - HCUFPR



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito dos diferentes modos e tempos de armazenamento sobre a acidez e valor calórico do leite humano ordenhado cru.

Pesquisador: Maria Celestina Bonzanini Grazziotin

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 03333112.0.0000.0096

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Parcial

Detalhe:

Justificativa: O foco desta pesquisa é salientar que as análises foram sobre o leite das mães com

Data do Envio: 13/06/2014

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 707.016

Data da Relatoria: 23/06/2014

Apresentação da Notificação:

Trata-se de um relatório parcial de um estudo aprovado em 26/07/2012, onde a pesquisadora propõe a alteração do título da pesquisa.

Objetivo da Notificação:

Incluir no título a informação da população do estudo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não se aplica.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

O relatório parcial apontou a necessidade de alteração do título da pesquisa para: Efeito dos diferentes modos e tempos de armazenamento sobre a acidez e o valor calórico do leite humano

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-900

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-1041

Fax: (41)3360-1041

E-mail: cep@hc.ufpr.br



HOSPITAL DE CLÍNICAS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - HCUFPR



Continuação do Parecer: 707.016

ordenhado cru de mães com recém nascidos internados numa unidade de Neonatologia, a justificativa está adequada e baseada na condução da pesquisa, além disso o fato de existir escassez na literatura traz a relevância da pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi apresentada a justificativa adequada além do relatório parcial da pesquisa.

Recomendações:

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos. Manter os documentos da pesquisa arquivado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Relatório parcial e justificativa para alteração do título adequados.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012, manifesta-se pela aprovação da Notificação. Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos. Manter os documentos da pesquisa arquivado.

É dever do CEP acompanhar o desenvolvimento dos projetos, por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à pesquisa.

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-900

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-1041

Fax: (41)3360-1041

E-mail: cep@hc.ufpr.br

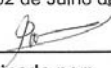


HOSPITAL DE CLÍNICAS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - HCUFPR



Continuação do Parecer: 707.016

CURITIBA, 02 de Julho de 2014


Assinado por:
Renato Tambara Filho
(Coordenador)

Endereço: Rua Gal. Carneiro, 181
Bairro: Alto da Glória CEP: 80.060-900
UF: PR Município: CURITIBA
Telefone: (41)3360-1041 Fax: (41)3360-1041 E-mail: cep@hc.ufpr.br

**ANEXO 2 - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP – SOLICITAÇÃO DE
MODIFICAÇÃO NO TÍTULO ORIGINAL DA PESQUISA**

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná - HCUFPR

PROJETO DE PESQUISA

Título: Efeito dos diferentes modos e tempos de armazenamento sobre a acidez e valor calórico do leite humano ordenhado cru.

Área Temática:

Pesquisador: Maria Celestina Bonzanini Grazziotin

Versão: 1

Instituição: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

CAAE: 03333112.0.0000.0096

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 65121

Data da Relatoria: 31/07/2012

Apresentação do Projeto:

A qualidade de vida e o desenvolvimento dos bebês prematuros e recém nascidos (RN) que necessitam de cuidados especiais, têm sido foco de preocupação em maternidades nos últimos anos. Entre muitos aspectos relacionados aos cuidados dos neonatos, a nutrição recebe grande atenção. Vários estudos nacionais e internacionais apontam para a importância do leite humano (LH) na nutrição destas crianças e seu uso está sendo muito estimulado nas Unidades de Terapia Intensiva Neonatal. O leite humano possui uma combinação especial e equilibrada de seus componentes, proporcionando benefícios nutricionais e imunológicos supre a incapacidade do RN em produzir enzimas digestivas, IgAs, nucleotídeos, taurina e ácidos graxos essenciais e promove uma digestão fácil e rápido esvaziamento gástrico. A composição do leite prematuro, produzido pela mulher cujo parto ocorreu antes de 37 semanas, comparado ao LH maduro, produzido pela mulher cujo parto ocorreu a partir da 37ª semana, contém maior concentração de Nitrogênio, proteínas, lipídeos totais, ácidos, ferro, vitaminas A, D, E, sódio e energia, o que o torna mais adequado a maioria das necessidades dos RNPT. O LH é considerado a primeira opção a todos RN, prematuro ou de termo, nos primeiros 6 meses de vida, em função de sua digestibilidade, composição química balanceada e capacidade de gerar imunidade. Estudos científicos comprovam que há variações na composição do leite conforme o tempo de lactação, a fim de satisfazer as necessidades e modificações fisiológica que acompanham o desenvolvimento fisiológico das crianças. Deste modo, o leite maduro não satisfaz integralmente as necessidades dos RNPT, embora seja ótima opção na falta do leite exclusivo da própria mãe. Pesquisa observacional, analítica, longitudinal, de coorte, prospectiva, que analisará os valores de acidez e caloria de amostras de leite humano ordenhado cru, submetidas a diferentes tempos e modos de armazenamento, sendo estes: fresco, refrigeração por 12 horas e sob congelamento por 15 dias, provenientes de mães cujos recém nascidos estejam internados na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTINeo) do Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Federal do Paraná (UFPR). A idade gestacional e tempo de lactação não serão considerados. Serão fornecidas orientações prévias às mães quanto à técnica correta para a ordenha manual do leite humano. De cada mãe será coletado, em procedimento único, o volume mínimo de 30 ml de leite em um frasco coletor individual. Deste, serão constituídas as três amostras, em três frascos distintos para as análises do leite fresco (1ª), refrigerado por 12 horas (2ª) e congelado por 15 dias (3ª). A análise da acidez e do valor calórico do leite humano amostrado para este projeto será realizada utilizando-se as técnicas padronizadas e validadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e adotadas pela Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano.

Objetivo da Pesquisa:

Geral: Analisar o grau de acidez e o valor calórico do leite humano ordenhado cru, submetido a diferentes modos e tempos de armazenamento.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Identificar o grau de acidez e o valor calórico de cada amostra coletada nos tempos e modos de armazenamento estipulados por esta pesquisa;
- b) Avaliar a variação do grau de acidez e do valor calórico entre as amostras de uma mesma mãe nos diferentes tempos e modos de armazenamento;
- c) Analisar a relação entre a variação do grau de acidez e a variação do valor calórico nas amostras de uma mesma mãe;
- d) Relacionar os resultados de acidez e valor calórico entre todas amostras coletadas de todas as mães que participaram da pesquisa;
- e) Averiguar se os resultados encontrados de acidez e valor calórico para todas as amostras de leite, estão dentro dos limites aprovados pela norma da ANVISA para distribuição do leite aos Recém Nascidos internados na UTI Neo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:**RISCOS**

Riscos: Este estudo não expõe as mães doadoras das amostras a riscos em sua integridade física ou mental. Os procedimentos realizados e aplicados aos sujeitos seguem o padrão normal de atendimento para as doações de leite humano em qualquer BLH e são aprovados pela ANVISA.

Benefícios: Mostrar que o leite humano ordenhado cru, submetido aos modos e tempos de armazenamento estudados, em relação ao seu estado fresco, não apresenta variações na sua acidez e calorias, que o tornem impróprio ao consumo para os recém nascidos internados na UTI Neo.

Este estudo trará subsídios aos profissionais de saúde da área de Neonatologia quanto ao uso mais seguro do leite humano ordenhado cru da própria mãe aos RN, como também economia ao hospital, que utilizará menor volume de leite artificial e do leite processado pelo BLH. As mães terão a oportunidade de colaborarem com o crescimento de seus bebês, e sentirem-se corresponsáveis pela sua recuperação, além de estabelecerem o vínculo com seu bebê e a equipe dos profissionais cuidadores.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa observacional, analítica, longitudinal, de coorte, prospectiva, que analisará os valores de acidez e caloria de amostras de leite humano ordenhado cru, submetidas a diferentes tempos e modos de armazenamento, sendo estes: fresco, refrigeração por 12 horas e sob congelamento por 15 dias, provenientes de mães cujos recém nascidos estejam internados na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTINeo) do Hospital de Clínicas (HC) da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Será preenchido um cadastro, a título de controle e registro do procedimento para coleta das amostras, cujos dados se resumem na identificação da doadora, endereço, telefone, orientação oferecida e avaliação da técnica de ordenha prévia a amostra a ser incluída na pesquisa. Serão coletadas amostras de leite humano de mães cujos recém nascidos estejam internados na Unidade de Terapia Intensiva Neonatal do HC-UFPR, de qualquer idade gestacional e tempo de lactação, desde que apresentem volume superior a 30 ml em um único procedimento de ordenha mamária.

Toda mãe incluída na pesquisa será acompanhada pelo pesquisador e auxiliada na técnica de ordenha mamária. Serão seguidas as recomendações técnicas para procedimentos em BLH (ANVISA, 2008). A coleta será realizada em sala específica, por meio de ordenha manual, uso de equipamentos e recipientes padronizados para todas as etapas de coleta, armazenamento, análises das amostras, e a paramentação adequada tanto da doadora como do pesquisador.

As técnicas para as análises serão as utilizadas como padrão pela REDEBLH, sendo sendo conhecida como Titulação de acidez pelo Método de Dornic e e a análise para o valor calórico pelo método de Crematócrito.

A coleta das amostras dar-se-ão entre os meses de Janeiro a Dezembro de 2013. Os resultados serão registrados em formulário próprio e depois lançados para análises. Serão coletadas amostras de leite das mães com recém-nascidos internados na Unidade de Terapia Intensiva neonatal do Hospital de clínicas, entre os meses de Outubro de 2012 a Julho de 2013, e a condução total da pesquisa será de março de 2012 a março de 2014. Será realizada no Banco de leite humano: sala de higienização, sala de coleta de leite, sala de processamento e armazenamento do LHOC.

Na UTINeo e Alojamento Conjunto para a captação das mães dos RN internados.

Trata-se de Prê-projeto apresentado ao Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Enfermeira MARIA CELESTINA BONZANINI GRAZZIOTIN como requisito para o processo seletivo de mestrado 2012 sob a orientação da Dra. Regina V. Cavalcanti da Silva e Co-orientação da

Dra Marcia Helena Freire.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados análise de mérito, carta do serviço de tocoginecologia, termo de confidencialidade, declaração de uso específicos dos dados coletados, declaração de tornar público, carta de encaminhamento ao cep.

O TCLE está em linguagem acessível e clara e também está contido o termo de assentimento para as mães entre 12 a 18 anos.

Recomendações:

É obrigatório trazer ao CEP/HC uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que foi aprovado, para assinatura e rubrica. Após, xerocar este TCLE em duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma para o participante da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não existem.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto conforme proposto para início da Pesquisa. Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

É obrigatório trazer ao CEP/HC uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que foi aprovado, para assinatura e rubrica. Após, xerocar este TCLE em duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma para o participante da pesquisa.

CURITIBA, 01 de Agosto de 2012

Assinado por:

Renato Tambara Filho

ANEXO 3 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO
(Adolescentes maiores de 12 anos menores de 18 anos).

Título do Projeto: "Efeitos dos diferentes modos e tempos de armazenamento sobre o valor de acidez e valor calórico do leite humano ordenhado cru"

Investigador: EnF Maria Celestina Bonzanini Grazziotin

Local da Pesquisa: Hospital de Clínicas da UFPR – Banco de leite Humano e Unidade de Neonatologia

Endereço: Rua General Carneiro, 181, centro Curitiba, PR

O que significa assentimento?

O assentimento significa que você concorda em fazer parte de um grupo de adolescentes, da sua faixa de idade, para participar de uma pesquisa. Serão respeitados seus direitos e você receberá todas as informações por mais simples que possam parecer.

Pode ser que este documento denominado TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO contenha palavras que você não entenda. Por favor, peça ao responsável pela pesquisa ou à equipe do estudo para explicar qualquer palavra ou informação que você não entenda claramente.

Informação ao Paciente: o que é uma pesquisa?

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa, com o objetivo de analisar a qualidade do leite humano ordenhado cru, no momento da ordenha e após ser submetido à refrigeração por 12 horas e ao congelamento por 15, e comparar se há alteração no seu grau de acidez e valor calórico, o que vai indicar se estas formas de armazenamento é adequada para o consumo ao prematuros internados.

Para que fazer a pesquisa?

Para termos um referencial científico que apóie os profissionais de saúde que atuam com crianças prematuras, quanto a melhor forma de armazenar e manusear o leite humano ordenhado da mãe ao próprio filho.

Como será feita?

A pesquisa será feita com amostra do leite de cada mãe que possui filho(a) internado na Neonatologia do HC-UFPR.


MARIA JOSÉ MOCELIN
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do HC/UFPR
Matrícula 7462

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal _____

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o
TCLE _____

A mãe ordenhará seu leite com acompanhamento do pesquisador, nas dependências da Neonatologia ou do Banco de Leite humano, e esta amostra será submetida às análises. É um procedimento de rotina orientado para todas mães que podem amamentar e que possuem seus bebês na Unidade. Então, esta coleta é apenas um procedimento habitual e será aproveitado o volume excedente à necessidade do bebê, aproximadamente 30 ml.

Quais os benefícios esperados com a pesquisa?

- 1 - Levar o conhecimento aos profissionais Enfermeiros e toda equipe, Nutricionistas, Médicos e demais da área da saúde sobre o manejo adequado com leite humano e, assim, estimularem ainda mais a oferta de leite da própria mãe aos bebês internados;
- 2 - Maior aproximação da mãe com seu filho(a) internado, aumenta o vínculo de mãe-filho e a mãe se sente valorizada por estar mais participante do seu cuidado;
- 3 - Com a colaboração para esta pesquisa, você estará contribuindo para o avanço científico, e no aumento dos índices de aleitamento materno.

Que devo fazer se eu concordar voluntariamente em participar da pesquisa?

A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado. A sua recusa não implicará na interrupção de seu atendimento e/ou tratamento, que está assegurado.

Não haverá despesas para a realização da pesquisa, não serão coletados exames, não será ministrado qualquer medicamento. A sua participação consiste apenas na coleta de, pelo menos 30 ml de seu leite para análise em laboratório, seguindo a própria rotina de nosso serviço no BLH. Pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro. Você terá a garantia de que será orientada da forma como está registrado em nossos procedimentos padrão para todas as mulheres mães que ordenham leite aos filhos (as) aqui internados.

Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e em nenhum momento será identificável, pois examinaremos as amostras de todas mães participantes da pesquisa, não sendo de interesse da mesma, de quem é a amostra, mas somente as possíveis alterações encontradas nas análises, quanto ao valor de acidez e calorias de cada amostra.

Contato para dúvidas

Se você ou os responsáveis por você tiver(em) dúvidas com relação ao estudo, direitos do participante, ou no caso de riscos relacionados ao estudo, você deve contatar o(a) Investigador(a) do estudo ou membro de sua equipe **Maria Celestina Bonzanini Grazziotin, telefone 33281408 e celular 92225373**. Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um paciente de pesquisa, você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone 3360-1041. O CEP é constituído por um grupo de profissionais de diversas áreas, com conhecimentos científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada da pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.


MARIA JOSÉ MOCELIN
 Membro do Comitê de Ética em Pesquisa
 em Seres Humanos do HCUFPR
 Matrícula 7462

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal _____

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o
 TCLE _____

**ANEXO 4 - TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(ADOLESCENTE MAIORES DE 12 ANOS E MENORES DE 18 ANOS)**

TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO
(Adolescentes maiores de 12 anos menores de 18 anos).

Título do Projeto: "Efeitos dos diferentes modos e tempos de armazenamento sobre o valor de acidez e valor calórico do leite humano ordenhado cru"

Investigador: EnF Maria Celestina Bonzanini Grazziotin

Local da Pesquisa: Hospital de Clínicas da UFPR – Banco de leite Humano e Unidade de Neonatologia

Endereço: Rua General Carneiro, 181, centro Curitiba, PR

O que significa assentimento?

O assentimento significa que você concorda em fazer parte de um grupo de adolescentes, da sua faixa de idade, para participar de uma pesquisa. Serão respeitados seus direitos e você receberá todas as informações por mais simples que possam parecer.

Pode ser que este documento denominado TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO contenha palavras que você não entenda. Por favor, peça ao responsável pela pesquisa ou à equipe do estudo para explicar qualquer palavra ou informação que você não entenda claramente.

Informação ao Paciente: o que é uma pesquisa?

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa, com o objetivo de analisar a qualidade do leite humano ordenhado cru, no momento da ordenha e após ser submetido à refrigeração por 12 horas e ao congelamento por 15, e comparar se há alteração no seu grau de acidez e valor calórico, o que vai indicar se estas formas de armazenamento é adequada para o consumo ao prematuros internados.

Para que fazer a pesquisa?

Para termos um referencial científico que apóie os profissionais de saúde que atuam com crianças prematuras, quanto a melhor forma de armazenar e manusear o leite humano ordenhado da mãe ao próprio filho.

Como será feita?

A pesquisa será feita com amostra do leite de cada mãe que possui filho(a) internado na Neonatologia do HC-UFPR.


MARIA JOSÉ MOCELIN
 Membro do Comitê de Ética em Pesquisa
 em Seres Humanos do HC/UFPR
 Matrícula 7462

Rubricas:
 Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal _____
 Pesquisador Responsável ou quem aplicou o
 TCLE _____

A mãe ordenhará seu leite com acompanhamento do pesquisador, nas dependências da Neonatologia ou do Banco de Leite humano, e esta amostra será submetida às análises. É um procedimento de rotina orientado para todas mães que podem amamentar e que possuem seus bebês na Unidade. Então, esta coleta é apenas um procedimento habitual e será aproveitado o volume excedente à necessidade do bebê, aproximadamente 30 ml.

Quais os benefícios esperados com a pesquisa?

- 1 - Levar o conhecimento aos profissionais Enfermeiros e toda equipe, Nutricionistas, Médicos e demais da área da saúde sobre o manejo adequado com leite humano e, assim, estimularem ainda mais a oferta de leite da própria mãe aos bebês internados;
- 2 - Maior aproximação da mãe com seu filho(a) internado, aumenta o vínculo de mãe-filho e a mãe se sente valorizada por estar mais participante do seu cuidado;
- 3 - Com a colaboração para esta pesquisa, você estará contribuindo para o avanço científico, e no aumento dos índices de aleitamento materno.

Que devo fazer se eu concordar voluntariamente em participar da pesquisa?

A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado. A sua recusa não implicará na interrupção de seu atendimento e/ou tratamento, que está assegurado.

Não haverá despesas para a realização da pesquisa, não serão coletados exames, não será ministrado qualquer medicamento. A sua participação consiste apenas na coleta de, pelo menos 30 ml de seu leite para análise em laboratório, seguindo a própria rotina de nosso serviço no BLH. Pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro. Você terá a garantia de que será orientada da forma como está registrado em nossos procedimentos padrão para todas as mulheres mães que ordenham leite aos filhos (as) aqui internados.

Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e em nenhum momento será identificada, pois examinaremos as amostras de todas mães participantes da pesquisa, não sendo de interesse da mesma, de quem é a amostra, mas somente as possíveis alterações encontradas nas análises, quanto ao valor de acidez e calorias de cada amostra.

Contato para dúvidas

Se você ou os responsáveis por você tiver(em) dúvidas com relação ao estudo, direitos do participante, ou no caso de riscos relacionados ao estudo, você deve contatar o(a) Investigador(a) do estudo ou membro de sua equipe **Maria celestina Bonzanini Grazziotin, telefone 33281408 e celular 92225373**. Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um paciente de pesquisa, você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone 3360-1041. O CEP é constituído por um grupo de profissionais de diversas áreas, com conhecimentos científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada da pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.


MARIA JOSÉ MOCELIN
 Membro do Comitê de Ética em Pesquisa
 em Seres Humanos do HCUFPR
 Matrícula 7462

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal _____

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o
 TCLE _____

ANEXO 5 - DECLARAÇÃO DE ASSENTIMENTO DO PACIENTE

DECLARAÇÃO DE ASSENTIMENTO DO PACIENTE:

Eu li e discuti com o investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar, e que posso interromper a minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito.

Eu entendi a informação apresentada neste TERMO DE ASSENTIMENTO. Eu tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas.

Eu receberei uma cópia assinada e datada deste Documento DE ASSENTIMENTO INFORMADO.

NOME DO ADOLESCENTE	ASSINATURA	DATA
---------------------	------------	------

NOME DO INVESTIGADOR	ASSINATURA	DATA
----------------------	------------	------


MARIA JOSE MOCELIN
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do HCUFPR
Matrícula 7462

Rubricas:
Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal _____
Pesquisador Responsável ou quem aplicou o
TCLE _____

**ANEXO 6 - VALORES CALÓRICOS DE ACORDO
COM A TABELA PADRÃO/REDEBLH/FIOCRUZ**

Tabela 1 de 2 - Valores calóricos

Coluna creme (cm)	Coluna total (cm)	Valor calórico (kcal/dL)	Coluna creme (cm)	Coluna total (cm)	Valor calórico (kcal/dL)	Coluna creme (cm)	Coluna total (cm)	Valor calórico (kcal/dL)	Coluna creme (cm)	Coluna total (cm)	Valor calórico (kcal/dL)	Coluna creme (cm)	Coluna total (cm)	Valor calórico (kcal/dL)
0,1	5,1	42,10	0,2	5,1	55,20	0,3	5,1	68,29	0,4	5,1	81,39	0,5	5,1	94,49
0,1	5,2	41,85	0,2	5,2	54,69	0,3	5,2	67,54	0,4	5,2	80,38	0,5	5,2	93,23
0,1	5,3	41,60	0,2	5,3	54,21	0,3	5,3	66,81	0,4	5,3	79,42	0,5	5,3	92,02
0,1	5,4	41,37	0,2	5,4	53,74	0,3	5,4	66,11	0,4	5,4	78,48	0,5	5,4	90,85
0,1	5,5	41,15	0,2	5,5	53,29	0,3	5,5	65,44	0,4	5,5	77,58	0,5	5,5	89,73
0,1	5,6	40,93	0,2	5,6	52,86	0,3	5,6	64,79	0,4	5,6	76,71	0,5	5,6	88,64
0,1	5,7	40,72	0,2	5,7	52,44	0,3	5,7	64,16	0,4	5,7	75,88	0,5	5,7	87,60
0,1	5,8	40,52	0,2	5,8	52,03	0,3	5,8	63,55	0,4	5,8	75,07	0,5	5,8	86,59
0,1	5,9	40,32	0,2	5,9	51,64	0,3	5,9	62,97	0,4	5,9	74,29	0,5	5,9	85,61
0,1	6,0	40,13	0,2	6,0	51,27	0,3	6,0	62,40	0,4	6,0	73,53	0,5	6,0	84,67
0,1	6,1	39,95	0,2	6,1	50,90	0,3	6,1	61,85	0,4	6,1	72,80	0,5	6,1	83,75
0,1	6,2	39,77	0,2	6,2	50,55	0,3	6,2	61,32	0,4	6,2	72,10	0,5	6,2	82,87
0,1	6,3	39,60	0,2	6,3	50,21	0,3	6,3	60,81	0,4	6,3	71,41	0,5	6,3	82,02
0,1	6,4	39,44	0,2	6,4	49,88	0,3	6,4	60,31	0,4	6,4	70,75	0,5	6,4	81,19
0,1	6,5	39,28	0,2	6,5	49,55	0,3	6,5	59,83	0,4	6,5	70,11	0,5	6,5	80,38
0,1	6,6	39,12	0,2	6,6	49,24	0,3	6,6	59,36	0,4	6,6	69,48	0,5	6,6	79,61
0,1	6,7	38,97	0,2	6,7	48,94	0,3	6,7	58,91	0,4	6,7	68,88	0,5	6,7	78,85
0,1	6,8	38,82	0,2	6,8	48,65	0,3	6,8	58,47	0,4	6,8	68,29	0,5	6,8	78,12
0,1	6,9	38,68	0,2	6,9	48,36	0,3	6,9	58,04	0,4	6,9	67,72	0,5	6,9	77,41
0,1	7,0	38,54	0,2	7,0	48,09	0,3	7,0	57,63	0,4	7,0	67,17	0,5	7,0	76,71
0,1	7,1	38,41	0,2	7,1	47,82	0,3	7,1	57,23	0,4	7,1	66,63	0,5	7,1	76,04
0,1	7,2	38,28	0,2	7,2	47,56	0,3	7,2	56,83	0,4	7,2	66,11	0,5	7,2	75,39

FONTE:REDEBLH/FIOCRUZ/RJ

Tabela 2 de 2 - Valores calóricos previamente calculados

Coluna creme (cm)	Coluna total (cm)	Valor calórico (kcal/dL)	Coluna creme (cm)	Coluna total (cm)	Valor calórico (kcal/dL)	Coluna creme (cm)	Coluna total (cm)	Valor calórico (kcal/dL)	Coluna creme (cm)	Coluna total (cm)	Valor calórico (kcal/dL)	Coluna creme (cm)	Coluna total (cm)	Valor calórico (kcal/dL)
0,6	5,1	107,59	0,7	5,1	120,69	0,8	5,1	133,78	0,9	5,1	146,88	1,0	5,1	159,98
0,6	5,2	106,08	0,7	5,2	118,92	0,8	5,2	131,77	0,9	5,2	144,62	1,0	5,2	157,46
0,6	5,3	104,62	0,7	5,3	117,23	0,8	5,3	129,83	0,9	5,3	142,43	1,0	5,3	155,04
0,6	5,4	103,22	0,7	5,4	115,59	0,8	5,4	127,96	0,9	5,4	140,33	1,0	5,4	152,70
0,6	5,5	101,87	0,7	5,5	114,02	0,8	5,5	126,16	0,9	5,5	138,31	1,0	5,5	150,45
0,6	5,6	100,57	0,7	5,6	112,50	0,8	5,6	124,43	0,9	5,6	136,36	1,0	5,6	148,29
0,6	5,7	99,32	0,7	5,7	111,04	0,8	5,7	122,75	0,9	5,7	134,47	1,0	5,7	146,19
0,6	5,8	98,10	0,7	5,8	109,62	0,8	5,8	121,14	0,9	5,8	132,66	1,0	5,8	144,17
0,6	5,9	96,93	0,7	5,9	108,25	0,8	5,9	119,58	0,9	5,9	130,90	1,0	5,9	142,22
0,6	6,0	95,80	0,7	6,0	106,93	0,8	6,0	118,07	0,9	6,0	129,20	1,0	6,0	140,33
0,6	6,1	94,70	0,7	6,1	105,66	0,8	6,1	116,61	0,9	6,1	127,56	1,0	6,1	138,51
0,6	6,2	93,65	0,7	6,2	104,42	0,8	6,2	115,19	0,9	6,2	125,97	1,0	6,2	136,74
0,6	6,3	92,62	0,7	6,3	103,22	0,8	6,3	113,83	0,9	6,3	124,43	1,0	6,3	135,03
0,6	6,4	91,63	0,7	6,4	102,06	0,8	6,4	112,50	0,9	6,4	122,94	1,0	6,4	133,38
0,6	6,5	90,66	0,7	6,5	100,94	0,8	6,5	111,22	0,9	6,5	121,49	1,0	6,5	131,77
0,6	6,6	89,73	0,7	6,6	99,85	0,8	6,6	109,97	0,9	6,6	120,09	1,0	6,6	130,21
0,6	6,7	88,82	0,7	6,7	98,79	0,8	6,7	108,76	0,9	6,7	118,73	1,0	6,7	128,70
0,6	6,8	87,94	0,7	6,8	97,76	0,8	6,8	107,59	0,9	6,8	117,41	1,0	6,8	127,24
0,6	6,9	87,09	0,7	6,9	96,77	0,8	6,9	106,45	0,9	6,9	116,13	1,0	6,9	125,81
0,6	7,0	86,26	0,7	7,0	95,80	0,8	7,0	105,34	0,9	7,0	114,89	1,0	7,0	124,43
0,6	7,1	85,45	0,7	7,1	94,86	0,8	7,1	104,27	0,9	7,1	113,68	1,0	7,1	123,08
0,6	7,2	84,67	0,7	7,2	93,94	0,8	7,2	103,22	0,9	7,2	112,50	1,0	7,2	121,78

FONTE:REDEBLH/FIOCRUZ/RJ